

**Laminin-2 und sein Rezeptor Dystroglykan in benignen und
malignen epithelialen Läsionen der Mamma**

DISSERTATION

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von
Constanze Stockmann-Fleck
geboren am 14.04.1977
in Gera**

Gutachter: I Herr Prof.Dr.med.H.Kosmehl, Institut für Pathologie,
Helios-Klinikum, Erfurt
II Herr Prof.Dr.med.P.Hyckel, Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie, FSU Jena
III Herr Priv.Doiz.Dr.med.habil.H.Urban, Institut für
Pathologie, Wald-Klinikum Gera

Tag der öffentlichen Verteidigung:

6.April 2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	5
1. ZUSAMMENFASSUNG	6
2. EINLETUNG	8
2.1. Extrazelluläre Matrix und Rezeptorproteine	8
2.1.1. Laminine als Strukturproteine der Basalmembran	8
2.1.1.1. Der Aufbau verschiedener Lamininisoformen	9
2.1.1.2. Die Lokalisation der Laminine	10
2.1.1.3. Genetische Störungen der Lamininexpression	10
2.1.2. Dystroglykan als Rezeptormolekül	11
2.1.2.1. Der Aufbau von Dystroglykan	11
2.1.2.2. Dystroglykan im Dystrophin/Utrophin-Komplex und seine extra- und intrazellulären Bindungspartner	12
2.1.3. Das Myoepithel - ein regulärer Zelltyp der duktulo-lobulären Einheit der Mamma	19
2.2. Die Bedeutung der Basalmembran für die Karzinominvasion	19
2.2.1. Die regulären Funktionen der Basalmembran	19
2.2.2. Funktionsverluste der Basalmembran	20
2.2.3. Strukturveränderungen der Basalmembran im Karzinom	20
2.3. Histologische Einteilung des Mammakarzinoms	21
2.3.1. Nichtinvasive Karzinome der Mamma	21
2.3.2. Invasiv duktales und invasiv lobuläres Karzinom der Mamma	21
2.4. Dystroglykan und Laminin-2 im gesunden Brustgewebe und in benignen und malignen Läsionen der Mamma	22
2.5. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	22
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1. Klinische Parameter	24
3.1.1. Patientengut der Untersuchung	24
3.1.2. Ausbreitung des Primärtumors nach TNM-Klassifikation	24
3.2. Tumormaterial	26

3.2.1.	Parafineinbettung und konventionelle Histologie	26
3.2.2.	Kryokonservierung für immunhistochemische Verfahren	27
3.3.	Immunhistochemische Technik	27
3.3.1.	Aufbereitung des Gewebematerials für immunhistochemische Verfahren	27
3.3.2.	Primäre Antikörper	27
3.3.3.	APAAP-Methode	28
3.3.4.	Immunhistochemische Kontrollen	29
3.3.5.	Verzeichnis der Puffer-, Farb- und Fixierlösungen	29
3.4.	Typisierung der Tumoren der Mamma	31
3.4.1.	Typisierung der benignen Veränderungen	31
3.4.2.	Typisierung der malignen Veränderungen	31
3.5.	Bewertungskriterien der Immunreaktion (Scoring)	31
3.6.	Statistische Auswertung	32
4.	ERGEBNISSE	33
4.1.	Qualitative Analyse des Auftretens von β-Dystroglykan und Laminin-2 im Gewebe der Mamma	33
4.1.1.	Gesundes Brustgewebe	33
4.1.1.1.	β -Dystroglykan im Gewebe der normalen, adulten weiblichen Brust	33
4.1.1.2.	Laminin-2 im Gewebe der normalen, adulten weiblichen Brust	34
4.1.2.	Atrophische Bereiche und Zysten der Brust	35
4.1.3.	Benigne Veränderungen der Brust	35
4.1.4.	Carcinoma in situ der Brust (DCIS)	36
4.1.4.1.	β -Dystroglykan im DCIS	37
4.1.4.2.	Laminin-2 im DCIS	37
4.1.5.	Invasive Karzinome der weiblichen Brust	38
4.1.5.1.	β -Dystroglykan in invasiv duktalem Karzinomen	39
4.1.5.2.	Laminin-2 in invasiv duktalem Karzinomen	39
4.1.5.3.	β -Dystroglykan und Laminin-2 in invasiv lobulären Karzinomen	40
4.2.	Quantitative Auswertung der Veränderungen von β-Dystroglykan und Laminin-2 im Gewebe der Mamma	41

4.2.1.	β -Dystroglykan und Laminin-2 in benignen Veränderungen der Mamma	42
4.2.2.	β -Dystroglykan und Laminin-2 in DCIS	42
4.2.3.	β -Dystroglykan und Laminin-2 in invasiv duktalem Karzinom	43
4.2.4.	β -Dystroglykan und Laminin-2 in invasiv lobulärem Karzinom	43
4.3.	Korrelation der β-Dystroglykan- und Laminin-2 -verluste mit dem Grading der Tumoren und der nodalen Metastasierung der Tumoren	43
4.3.1.	Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading	44
4.3.1.1.	Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading der Carcinoma in situ	44
4.3.1.2.	Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading der invasiv duktalem Karzinome	45
4.3.1.3.	Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading der invasiv lobulären Karzinome	46
4.3.2.	Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit der nodalen Metastasierung der Tumoren	47
4.3.2.1.	Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit der nodalen Metastasierung der invasiv duktalem Karzinome	48
4.3.2.2.	Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit der nodalen Metastasierung der invasiv lobulären Karzinome	49
4.4.	Myoepitheliale Zellen	50
4.4.1.	Qualitative Beschreibung des Myoepithels	50
4.4.2.	Quantitative Beschreibung des Myoepithels	51
5.	DISKUSSION	53
5.1.	Laminin-2 und sein Rezeptor Dystroglykan sind reguläre Bestandteile des duktalem Epithels der Mamma	53
5.1.1.	Laminin-2 als regulärer Bestandteil des Mammaepithels	53
5.1.2.	Dystroglykan als regulärer Bestandteil des Mammaepithels	54
5.2.	Die konstante Expression von Laminin-2 und Dystroglykan in benignen histopathologischen Läsionen der Mamma	56
5.3.	Der Verlust von Laminin-2 und seinem Rezeptor Dystroglykan in nichtinvasiven und invasiven Karzinomen der Mamma	56

5.3.1.	Die Reduktion von Laminin-2 und Dystroglykan im intraduktalen Karzinom (DCIS)	57
5.3.2.	Die verminderte Expression von Laminin-2 im invasiven Karzinom der Mamma	58
5.3.3.	Die reduzierte Expression von Dystroglykan im invasiven Karzinom der Mamma	58
5.3.4.	Mögliche Ursachen der verminderten Expression	59
5.4.	Veränderungen von Laminin-2 und Dystroglykan korrelieren mit der malignen Transformation und nicht mit der Tumorprogression	60
5.5.	Histopathologische und diagnostische Bedeutung des Verhaltens Von Laminin-2 und Dystroglykan im Mammakarzinom	61
5.6.	Die Beziehung zwischen Dystroglykan, Laminin-2 und myoepithelialer Differenzierung in der Mamma	62
5.6.1.	Eignung des Myoepithels zur Differenzierung zwischen benignem und malignem Wachstum	63
5.6.2.	Der Verlust von Laminin-2, Dystroglykan und myoepithelialen Zellen im Vergleich	64
6.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	65
7.	ANHANG	67
8.	LITERATURVERZEICHNIS	69
9.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	81
10.	DANKSAGUNG	82
11.	LEBENS LAUF	83

Abkürzungsverzeichnis

ACh-R	Acetylcholinrezeptor
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
ASMA	Alpha-Smooth-Muscle-Actin
BM	Basalmembran
LFV	Lassa-Fieber-Virus
CMD	congenitale Muskeldystrophie
DAP	Dystrophin-assoziierte Proteine
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DG	Dystroglykan
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
ECM	Extrazelluläre Matrix
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HE	Haematoxylin-Eosin
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LCMV	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus
MASC	Myotubulus-assoziierte Komponente
NMJ	neuromuskuläre Junktion
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SG	Sakroglykan
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Trihydroxymethylaminomethan

1. Zusammenfassung

Ausgehend von der Hypothese, dass der bislang vorrangig im Muskel bekannte Rezeptor Dystroglykan und sein Ligand Laminin-2 auch Bestandteile des Epithels sein können, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die immunhistochemische Darstellung der β -Untereinheit von Dystroglykan und der α 2-Kette von Laminin-2 in gesundem Gewebe, sowie in benignen und malignen Veränderungen der menschlichen, weiblichen Brust.

Schockgefrorene Proben der entsprechenden Läsionen der weiblichen Mamma waren Grundlage der immunhistochemischen Studie. Die APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) wurde als Detektionssystem für die monoklonalen Antikörper gegen die α 2-Kette von Laminin-2 (Klon 5H2) und gegen die β -Untereinheit von Dystroglykan (Klon 43DAG1/8D5) eingesetzt.

Es konnte im gesunden Epithelium der Milchgänge, das in den meisten Präparaten zufällig mit angeschnitten war, und in den zehn benignen Veränderungen (Fibrosen, Mastitiden, Papillome, Duktusproliferationen und Narbengewebe) die regelmäßige, kontinuierliche Immunmarkierung von der α 2-Kette von Laminin und von der β -Untereinheit von Dystroglykan im Bereich der Basalmembranen bzw. der BM-Zell-Interface der Duktus und Lobuli gezeigt werden. Gesundes Mammaepithel und benigne histopathologische Läsionen zeigen keine Veränderung bezüglich des Vorkommens von Dystroglykan und Laminin-2. Die Zell-Matrix-Interaktion, vermittelt durch Laminin-2 und Dystroglykan, ist im gesunden Gewebe und in benignen Veränderungen intakt.

Im Gegensatz zu den gutartigen Veränderungen zeigten bereits die 11 duktales Carcinoma in situ (DCIS) weitgehende Verluste von Ligand und Rezeptor.

Eine verminderte Expression fand sich in jedem der 69 Präparate (15 invasiv lobulären und 54 invasiv duktales Karzinome der Mamma). In Übereinstimmung mit der Literatur waren Laminin-2 und Dystroglykan in jeder malignen Veränderung nur in reduziertem Maße nachweisbar. 54 Präparate zeigten einen kompletten Verlust von Laminin-2 und 41 Präparate wiesen einen kompletten Verlust von Dystroglykan auf. Jede invasive, karzinomatöse Progression ist mit einem Verlust von Dystroglykan, Laminin-2 und myoepithelialen Zellen verbunden. Sukzessiv, parallel zum Fortschreiten des Karzinoms gehen der Rezeptor Dystroglykan, sein Ligand, Laminin-2 und die myoepitheliale Differenzierung verloren.

Das Vorhandensein von Laminin-2 und seinem Rezeptor Dystroglykan ist aus muskulärem Gewebe bekannt. Dass die Expression auch im Epithel und der assoziierten Basalmembran zu finden war, entsprach den Erwartungen auf Grund der Erkenntnisse aus Studien an Lunge und Niere. In der vorliegenden Untersuchung konnte festgestellt werden, dass Laminin-2 und β -Dystroglykan reguläre Bestandteile des duktales Epithels der Mamma sind.

Da eine verminderte Expression bereits im duktales Carcinoma in situ zu finden ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine Korrelation zur malignen Transformation vorliegt. Dystroglykan und Laminin-2 können infolge der Ergebnisse der eigenen Untersuchung als Marker der frühen Phase der Tumorentstehung gesehen werden. Eine statistisch signifikante Korrelation zur Tumorprogression, also der späten Phase des Tumorwachstums, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, wenn auch ein Trend in den erhobenen Daten erkennbar war, der auf eine mögliche Korrelation hinweist. Deutlich wurde jedoch, dass eine intakte Dystroglykan- und Laminin-2-Beziehung ein Karzinom ausschließen kann. Die immunhistochemische Bewertung der Dystroglykan-Laminin-2-Interaktion trägt die Potenz in sich, frühe karzinomassoziierte Differenzierungsstörungen bzw. gestörte Zell-Matrix-Interaktionen aufzuzeigen. Das Fehlen der beiden Glykoproteine lässt die Annahme zu, dass ein Karzinom der Mamma vorliegt. Eine Unterscheidung zwischen invasivem und nicht-invasivem, sowie metastasiertem und nicht-metastasiertem Karzinom kann durch die Bestimmung der veränderten Expression von Dystroglykan und Laminin-2 nicht getroffen werden. Die Richtigkeit der eigenen Ergebnisse wurde durch den bereits bekannten, koinzidenten Verlust des Myoepithels bestätigt. Ungeklärt bleibt jedoch die Antwort auf die Frage, ob zuerst das Myoepithel oder zuerst Dystroglykan und sein Ligand vermindert nachweisbar sind.

Problematisch ist derzeit noch die Tatsache, dass die Notwendigkeit der Verwendung von Gefriermaterial zur Darstellung von Laminin-2 und Dystroglykan gegenüber formalinfixiertem, paraffinebettetem Material zur histologischen Diagnosestellung einer Erkrankung eines Organs die Anwendung der Methode in der Routinediagnostik erschwert.

2. Einleitung

2.1. Extrazelluläre Matrix und Rezeptorproteine

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein wichtiger Bestandteil aller Gewebe. Sie beeinflusst die Entwicklung und die Morphogenese des Zellverbandes in entscheidendem Maße. So wirkt sie auf die Differenzierung, die Proliferation sowie die Migration der Zellen ein und hat damit einerseits eine gewebstabilisierende Funktion und kann andererseits gewebssarchitekturmodulierende Prozesse durch Bereitstellung von Adhäsionspunkten unterstützen (Kosmehl et al., 1996). Die Aktivierung von intrazellulären Transduktionswegen durch die Adhäsion von Zellen an andere Zellen oder an extrazelluläre Matrixmoleküle ist bedeutsam für die Gewebedifferenzierung. Das Zusammenspiel zwischen den Proteinen, die Bindung an ihre Rezeptoren und damit die Auslösung weiterer Reaktionsketten ist Voraussetzung für vielfältige physiologische Vorgänge in den Zellen.

Die extrazelluläre Matrix bildet keine statische Struktur, sondern stellt ein permanent neu produziertes und ständig umgebautes Netzwerk aus Proteinen dar. Sie dient in erster Linie der Regulation der Zellfunktion (Sechler et al., 1998). Defekte dieser Strukturelemente haben gravierende pathologische Konsequenzen für das Zellwachstum (Hynes, 1996).

2.1.1. Laminine als Strukturproteine der Basalmembran

Laminine sind Proteine der extrazellulären Matrix. Sie beeinflussen die Differenzierung und die Proliferation der Zellen (Wewer und Engvall, 1996; Timpl und Brown, 1996). Laminine bilden als große nicht-kollagenöse Glykoproteine zusammen mit Kollagen Typ IV, Proteoglykanen (Perlekan) und anderen Glykoproteinen wie Nidogen, die Grundstruktur der Basalmembran (Wewer und Engvall, 1996). Die hohe Affinität der strukturellen Elemente zueinander ist bedeutsam für den Aufbau der Basalmembran. Laminine sind Teil des Strukturgerüsts, das physiologische Informationen weiterleitet, teils direkt durch Zellkontakte, teils indirekt durch die Bindung von Substanzen wie verschiedener Wachstumsfaktoren (Aumailley und Smyth, 1998). Laminine sind demzufolge basalmembranspezifische Haftproteine für epitheliale, endotheliale und andere mesenchymale Zellen (Rohrbach, 1995).

Während der Ontogenese sind sie als erste Glykoproteine nachweisbar (Rohrbach, 1995). Ihr Einfluss auf die frühe Entwicklung der Basalmembran und somit auf die Entwicklung des Embryos ist von ausschlaggebender Bedeutung, da Störungen der Lamininexpression den Fruchttod bedeuten (Aumailley und Smyth, 1998).

Dass auch die Funktion der Brustdrüse von der Funktionstüchtigkeit der Laminine abhängig ist, belegt die verminderte Milchproduktion bei reduzierter Lamininausprägung (Streuli et al., 1995).

2.1.1.1. Der Aufbau verschiedener Lamininisoformen

Es handelt sich bei Lamininen um aus drei Untereinheiten (α -, β - und γ -Ketten) bestehende Makromoleküle. Gegenwärtig sind fünf α -Ketten, drei β -Ketten und drei γ -Ketten bekannt (Engvall und Wewer, 1996). Bisher wurden zwölf genetisch verschiedene Laminine bei Säugetieren und zwei verschiedene Isoformen bei Fliegen und Nematoden identifiziert (Burgeson et al., 1994; Richards et al., 1994; Iivanainen et al., 1995; Miner et al., 1995; Champlaud et al., 1996; Koch et al., 1999; Martin et al., 1999; Hutter et al., 2000).

Tab.1: Lamininisoformen (nach Wewer und Engvall, 1996).

Lamininsubtyp	Synonyma	Enthaltene Untereinheiten
Laminin-1	klassisches Laminin	$\alpha 1 - \beta 1 - \gamma 1$
Laminin-2	Merosin	$\alpha 2 - \beta 1 - \gamma 1$
Laminin-3	S-Laminin	$\alpha 1 - \beta 2 - \gamma 1$
Laminin-4	S-Merosin	$\alpha 2 - \beta 2 - \gamma 1$
Laminin-5	Kalinin, Epiligrin, Nicein	$\alpha 3 - \beta 3 - \gamma 2$
Laminin-6	K-Laminin	$\alpha 3 - \beta 1 - \gamma 1$
Laminin-7	SK-Laminin	$\alpha 3 - \beta 2 - \gamma 1$
Laminin-8		$\alpha 4 - \beta 1 - \gamma 1$
Laminin-9		$\alpha 4 - \beta 2 - \gamma 1$
Laminin-10		$\alpha 5 - \beta 1 - \gamma 1$
Laminin-11		$\alpha 5 - \beta 2 - \gamma 1$
Laminin-12		$\alpha 2 - \beta 1 - \gamma 3$

2.1.1.2. Die Lokalisation der Laminine

Laminine sind an der internen und der externen Lamina rara der Basalmembran lokalisiert (Rohrbach, 1995). Mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz und unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen einzelne Ketten konnten Laminine in der Basalmembran von Trophoblasten der menschlichen Plazenta, in der Zunge und in den Nerven des Menschen und im Kolon von Affen nachgewiesen werden (Ehrig et al., 1990).

Merosin ist ein Sammelbegriff für alle Laminine, die die $\alpha 2$ -Kette besitzen (Tab. 1). Laminin-2 gehört aufgrund seines Aufbaus - $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 2$ - zur Gruppe der Merosine (Wewer und Engvall, 1996). Der Nachweis der $\alpha 2$ -Kette gelang in der Basalmembran von Herzmuskelgewebe und von Nervengewebe des Menschen (Schuler und Sorokin, 1995), in Keratinozyten der Haut (Schuler und Sorokin, 1995; Sewry et al., 1996), im Thymus (Chang et al., 1993), in der Niere (Virtanen et al., 1995), im Neuroepithel des ZNS und im Pigment- und Linsenepithel des Auges (Sorokin, unveröffentlichte Daten, erwähnt in Ringelmann et al., 1999).

2.1.1.3. Genetische Störungen der Lamininexpression

Ein Verlust oder eine Fehlbildung einer Lamininkette, die aufgrund einer Mutation im Genom auftreten kann, stellt die Ursache für verschiedene Erkrankungen dar (Tinsley et al., 1994; Campbell, 1995; Campbell und Crosbie, 1996; Wewer und Engvall, 1996). Ein Merosinverlust kann nicht vollständig durch andere Lamininisoformen ausgeglichen werden (Mc Dearmon et al., 1998).

Die kongenitale, autosomal-rezessiv erbliche Muskeldystrophie (CMD) ist assoziiert mit einer Veränderung von Laminin-2. Die dy/dy-Maus, ein Modell für die CMD, weist eine Verminderung beziehungsweise einen Verlust der $\alpha 2$ -Ketten des Laminins auf (Wewer und Engvall, 1996). Weiterhin findet sich in den modifizierten Muskelzellen der dy/dy-Maus auch eine Verminderung der β - und γ -Ketten und eine weniger starke Bindungsaffinität zwischen Laminin und α -Dystroglykan.

Mit Störungen der Laminin-2 -Produktion gehen Fehlentwicklungen des ZNS - alle Laminine fördern das Nervenwachstum (Engvall, 1993) - und des Auges einher.

Nicht nur Störungen der Merosinsynthese führen zu schwerwiegenden Veränderungen. Auch Laminin-5, das epitheliale Laminin, ist bei Morbus Herlitz

(Epidermolysis bullosa hereditaria letalis), einer blasenbildenden, autosomal-rezessiv vererbten Hauterkrankung, verändert (Wewer und Engvall, 1996).

Fehlt das β 2-Ketten-Gen, ist ein postpartales Überleben nicht möglich, da die Nierenfunktion erheblich beeinträchtigt ist und die neuromuskuläre Überleitung nicht regelrecht funktioniert (Durbeej et al., 1996).

Die exemplarisch dargestellte Zusammenstellung derartiger schwerwiegender Krankheitsbilder, bei denen die Lebenserwartung der Patienten deutlich vermindert ist, zeigt, dass Laminine essentiell für die Zellintegrität und die regulären Zellfunktionen sind (Wewer und Engvall, 1996).

2.1.2. Dystroglykan als Rezeptormolekül

Dystroglykan ist ein Laminin-bindendes Glykoprotein (Smalheiser und Schwartz, 1987). Es konnte als ein Dystrophin-assoziiertes-Protein geklont werden (Ibraghimov-Breskrovnaya et al., 1992) wobei sich herausstellte, dass es identisch mit dem bis dahin bekannten Kranin ist (Smalheiser und Kim, 1995).

2.1.2.1. Der Aufbau von Dystroglykan

Dystroglykan ist ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Makromolekül. Die posttranslationale Modifikation (Spaltung und Glykosylierung) des Präkursorproteins (97 kDa) führt zur Bildung der α -Einheit (156 kDa) und der β -Einheit (43 kDa) (Abb. 1) (Ervasti et al., 1990, Ibraghimov-Breskrovnaya et al., 1992).

60 % der Masse des α -Dystroglykanmoleküls sind auf die genannte Glykosylierung zurückzuführen (Brancaccio et al., 1995). Weitere Kopplungsreaktionen führen zu unterschiedlich schweren Molekülen. So ist das Dystroglykan des peripheren Nerven nur 120 kDa schwer im Gegensatz zum 156 kDa schweren Dystroglykan der Skelettmuskulatur (Rambukkana et al., 1998).

Die α - und die β -Untereinheiten werden auf den Chromosomen 3p21 und 9 kodiert (Ibraghimov-Breskrovnaya et al., 1993; Gorecki et al., 1994). Die α -Dystroglykan-mRNA enthält interessanterweise auch die β -Dystroglykan-Sequenz (Ibraghimov-Breskrovnaya et al., 1992).

2.1.2.2. Dystroglykan im Dystrophin/Utrophin-Komplex und seine extra- und intrazellulären Bindungspartner

Dystroglykan stellt einen wesentlichen Teil der Verbindung zwischen extrazellulärem Raum und dem Zytoskelett her und interagiert mit einer Vielzahl von Bindungspartnern (Tab. 2). Die α -Untereinheit, der extrazellulär gelegene Teil des Makromoleküls, bindet Laminin-2. Die Bindung erfolgt an die E3 (like G) - Domäne der $\alpha 1$ -Kette des Laminins-2 (Durbeej und Ekblom, 1997). Die transmembranal, im Sarkolemm lokalisierte β -Untereinheit bindet Dystrophin, ein intrazellulär gelegenes Protein, das der Muskelkontraktion dient (ter Laak et al., 1997).

Es entsteht somit die folgende Verbindung zwischen extra- und intrazellulären gelegenen Strukturen in Muskelzellen (siehe Abb. 1 und 3): Laminin 2 ist mit der Basalmembran verbunden; α -Dystroglykan bindet an Laminin 2; β -Dystroglykan hat Kontakt zu Dystrophin und Dystrophin seinerseits bindet Aktin, ein intrazelluläres Protein, welches für die Muskelkontraktion von Bedeutung ist (Ervasti und Campbell, 1993; Henry und Campbell, 1996).

Dystroglykan ist selbst indirekt an der Muskelkontraktion beteiligt, indem es als mechanischer Verstärker fungiert. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der normalen Muskelfunktion. Außerdem dient es der strukturellen Integrität des Sarkolemm. Die Bindung zwischen α -Dystroglykan und Laminin dient letztendlich der Stabilität von Muskelzellen (Brancaccio et al., 1995).

Der direkte intrazelluläre Bindungspartner von DG ist noch nicht sicher identifiziert. Wahrscheinlich ist, dass eine Bindung mit Utrophin und/oder Dystrophin Dp71/Dp140 erfolgt (Durbeej et al., 1997).

Die Dystroglykanexpression in nicht-muskulärem Gewebe zeigt, dass DG unabhängig von Dystrophin (das muskelspezifisch ist) seine Funktion in der Zelle ausüben kann. In nicht-muskulärem Gewebe wird DG im wesentlichen durch das homologe Utrophin stabilisiert (Schofield et al., 1995). Sein Vorkommen in diesen Geweben weist darauf hin, dass sich seine Funktion offensichtlich nicht nur auf die Unterstützung der Muskelkontraktion beschränkt (Ibraghimov-Breskrovnaya et al., 1992, 1993).

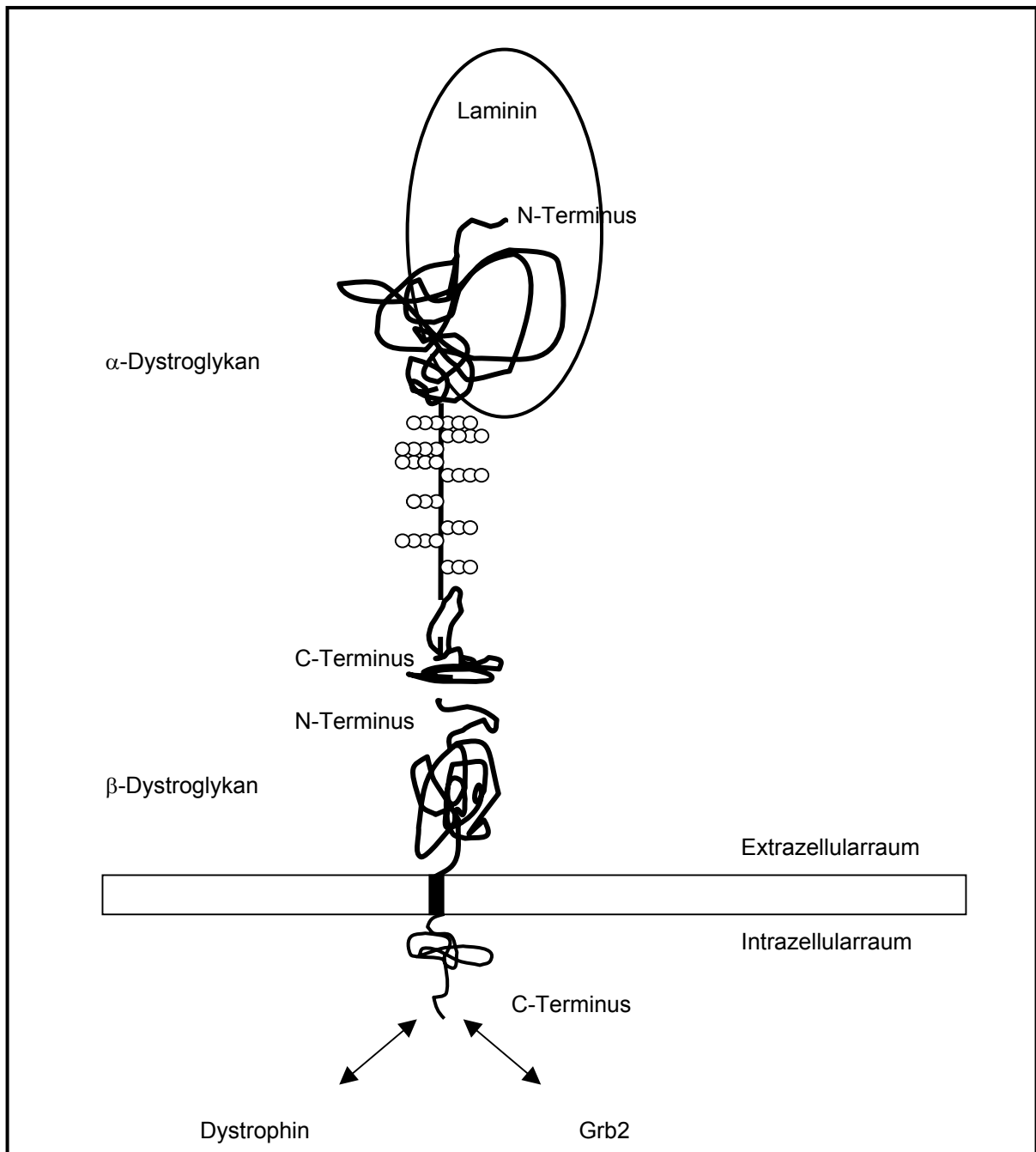


Abb. 1: Schematische Darstellung des Dystroglykankomplexes (nach Henry und Campbell, 1996).

Für die signaltransduzierende Funktion des Dystroglykans besteht gegenwärtig folgendes Erklärungsmodell: Der intrazelluläre Carboxyteil von β-Dystroglykan enthält eine mit Phosphotyrosin übereinstimmende Sequenz und mehrere Prolin-haltige Regionen, welche mit den SH2- und SH3-Domänen von Signalproteinen assoziiert sein können (Ibraghimov-Breskrovnya et al., 1992). Der Carboxyteil bindet Grb 2, ein Wachstumsfaktor-gebundenes Adaptorprotein in der

Signalverarbeitung, dass eine SH2- und SH3-Domäne aufweist (Yang et al., 1995; Cavaldesi et al., 1999) (siehe Abb. 1). Grb2 moduliert die Organisation des Zytoskeletts (Chardin et al., 1995) und die Dystroglykan-Dystrophin-Bindung (Jung et al., 1995). Die SH-Domänen beinhalten Adapterproteine der Signalverarbeitung. Dieses Zusammenwirken von Proteinen mit Dystroglykan ist ein weiterer Hinweis darauf, dass DG fähig ist, die Signaltransduktion direkt zu beeinflussen (Matsumura et al., 1997).

Tab. 2: DG-bindende und assoziierte Proteine (nach Winder 2001).

<u>Protein</u>	<u>Funktion</u>	<u>Referenzen</u>
DG-Komplex-Komponenten		
Dystroglykan	α -DG bindet Laminin, β -DG bindet Dystrophin oder Utrophin	
Dystrobrevin	Assoziiert mit dem C-Terminus von Dystrophin oder Utrophin	Bredt, 1999
Dystrophin	Vorkommen in Muskel- und Nervengewebe, verbindet β -DG mit Aktin, verändert bei DMD	Winder, 1997
Sarkoglykan	Transmembranärer Subkomplex, Funktion unklar, Mutation führt klinisch zu Muskeldystrophie	Lim and Campbell, 1998
Syntrophin	Zytoplasmatische Proteine, die mit Dystrophin oder Utrophin assoziiert sind, binden an Natrium-Kanäle	Kachinsky et al., 1999
ECM		
Laminin	BM-Glykoprotein, α -DG wird über den C-Terminus an α 1- oder α 2-Untereinheit gebunden	Cognato and Yurchenco, 2000
Agrin	Proteoglykan, neuronale Form besitzt AchR-bindende Aktivität	Hoch, 1999
Biglykan	α -DG-bindendes Proteoglykan	Bowe et al., 2000
Perlekan	Heparin-Sulfat-Proteoglykan mit hoher Affinität für Calcium-abhängige α -DG-Bindung, konkurriert mit Laminin	Iozzo, 1998
Andere		
Utrophin	Homolog zu Dystrophin, ubiquitäres Vorkommen,	Tinsley et

	verbindet β -DG mit Aktin, kann Dystrophin im dystrophischen Muskel funktionell ersetzen	al., 1992; Tinsley et al., 1996 Winder 1997
Grb2	Bindet β -DG, Adaptorprotein in der Signalverarbeitung, beinhaltet SH2- und SH3-Domäne	Lowenstein et al., 1992; Yang et al., 1995
Rapsyn	NMJ-Protein assoziiert mit AChR und β -DG	Hoch, 1999

Über seine Funktion in nicht-muskulären Zellen ist weniger bekannt als über die Rolle des Dystroglykans im Muskel. Im Kleinhirn ließ sich feststellen, dass α -Dystroglykan mit der α 2-Kette des Laminins an der Basalmembran von Blutgefäßen verbunden ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass β -Dystroglykan zu den perivaskulären Astrozyten Kontakt hat. Dieser Zusammenhang lässt vermuten, dass das DG-Molekül große Bedeutung für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke besitzt (Tian et al., 1996).

Des Weiteren spielt DG eine Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Morphogenese von Epithelien, der Myogenese, der Myelogenese, der Synaptogenese und der Stabilisierung des Sarkolemms (Matsumura et al., 1997).

Die Interaktionen zwischen Dystroglykan und Laminin-2 sind wichtig für die epitheliale Morphogenese in der Niere, in der Lunge und in den Speicheldrüsen (Durbeej et al., 1998a). Während der Ontogenese und der Myogenese der Nieren wurde eine Zunahme des Gehaltes an Dystroglykan-mRNA festgestellt (Kostrominova und Tanzer, 1995; Durbeej et al., 1995). Das Auftreten von Dystroglykan während der Ontogenese wurde von Tome und Mitarbeitern (1994) beschrieben: innerhalb der ersten 32 Lebenswochen des menschlichen Fötus erfolgt eine kontinuierliche Zunahme des Glykoproteinsgehalts, bis ein stabiles Plateau erreicht ist.

An der neuromuskulären Endplatte ist Dystroglykan am Aufbau von Synapsen, insbesondere des Acetylcholin-Rezeptor-Komplexes, beteiligt (Bowe et al., 1994; Campanelli et al., 1994; Gee et al., 1994; Sugiyama et al., 1994). Ursprünglich wurde DG als determinierender Faktor für die initiale Bildung des Acetylcholin-Rezeptor-Komplexes gesehen. Montanaro und Mitarbeiter (1998) beschrieben DG jedoch als lediglich unterstützendes und festigendes Protein für den Rezeptor (Abb. 2).

Agrin ist ein BM-assoziiertes Heparinsulfat-Proteoglykan, das eine hohe Affinität zum DG aufweist. Es beinhaltet drei Laminin-ähnliche Domänen am COOH-Terminus, die α -Dystroglykan binden. Am NH-Terminus stellt Agrin Kontakt zu Lamininen her (Denzer et al., 1998). Rapsyn bindet Dystrophin an Acetylcholin (Cartaud et al., 1998).

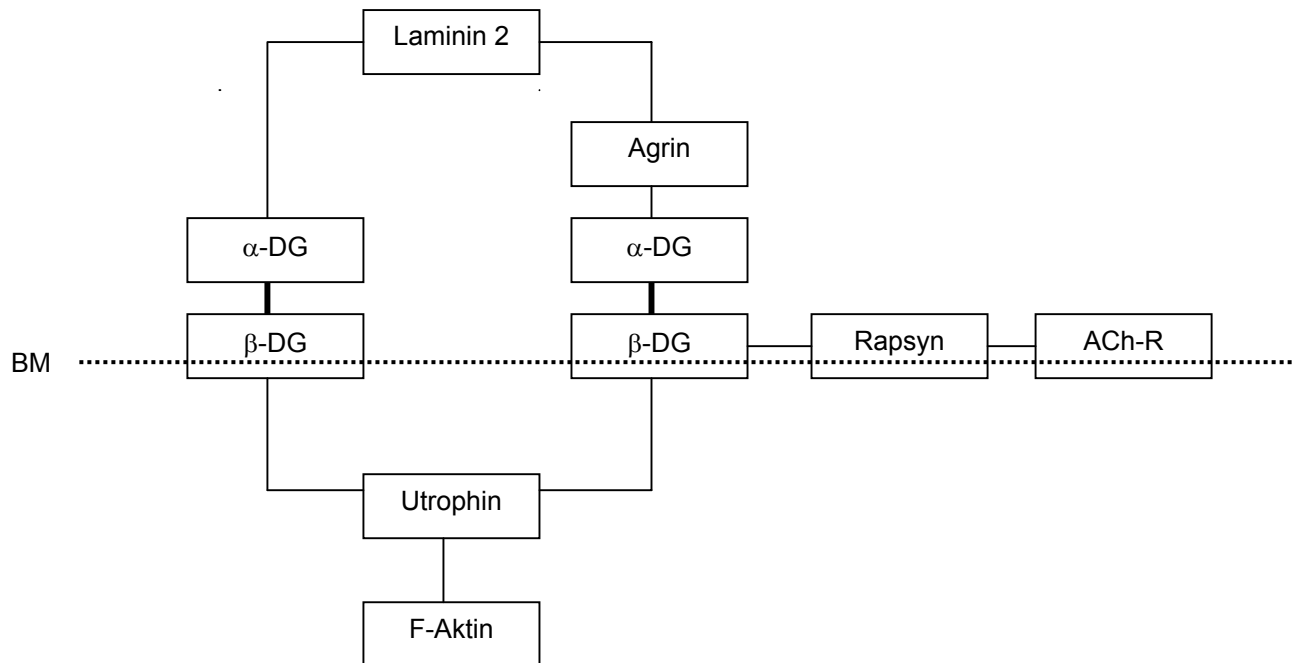


Abb. 2: DG in der Basalmembran (BM) der muskulären Endplatte (nach Hemler, 1999).

Bezüglich der physiologischen Wirkungsweise des Dystroglykans bestehen nach Matsumura et al. (1997) folgende Hypothesen (Abb. 3):

- a) Interaktionen mit intrazellulären Prozessen
- b) Modellierung von Rezeptoren
- c) Co-Rezeptor-Funktion
- d) ECM-Bindung und Reorganisation von Rezeptoren

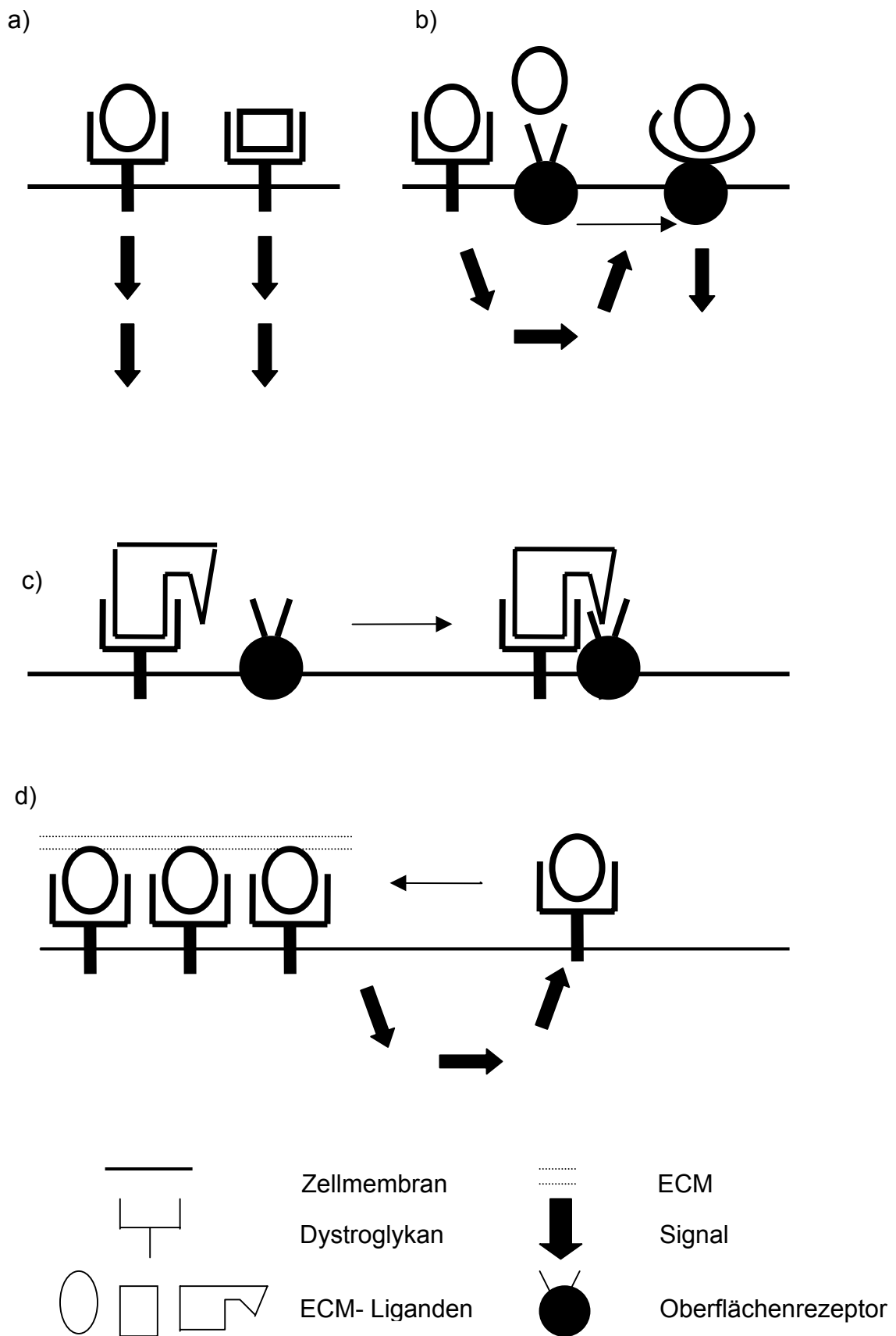


Abb. 3: Schematisches Modell der physiologischen Funktionen des Dystroglykankomplexes (nach Matsumura et al., 1997).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass Dystroglykan ein Triggerfaktor zur Reorganisation des submembranal gelegener Strukturen wie dem Dystrophin/Utrophin-Komplexe ist und damit einen zur Zellstabilisation dienenden Faktor darstellt (Matsumura et al., 1997).

Mäuse ohne Dystroglykan zeigten Abnormalitäten in der frühen Embryogenese (zwischen 6. und 7. Tag). Ein zeitiger Defekt im DG führt zur Unterbrechung der Reichertschen Membran (Williamson et al., 1997). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass DG eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Basalmembran spielt. Henry und Campbell beschrieben 1998 Unterbrechungen in Ausbildung der subendodermalen Basalmembran in Zellkulturen bei Fehlen von DG.

Im Nierengewebe, das eine Adriamycin-bedingte Nephropathie aufweist, wurde ein Verlust von Dystroglykan beschrieben. Kontinuitätsunterbrechungen waren nachweisbar und es zeigte sich eine segmentale Anreicherung von DG an der Basalseite der Podozyten (Raats et al., 2000).

Ist die Expression von Dystrophin vermindert, kommt es auch zu einer Reduktion der Dystrophin-assoziierte Proteine (DAPs). Zu diesem Dystrophin-assoziierten Komplex gehören α - und β -Dystroglykan und das 50 kDa schwere Adhalin (Schofield et al., 1995). Bei den Muskeldystrophien vom Typ Duchenne und vom Typ Becker-Kiener zeigt sich neben einer Verminderung von Dystrophin auch ein Abnahme der DAPs (Matsumura et al., 1993). Ein tierexperimentelles Beispiel für die genannten Muskeldystrophien ist das mdx-Maus-Modell, bei dem ein nur unvollständig ausgebildetes Dystrophin vorliegt.

Das Vorkommen von DG wurde auch in anderen Zusammenhängen beschrieben. Es ist als Rezeptor für das die lymphozytäre Choriomeningitis verursachende Virus (LCMV), das Lassa-Fieber-Virus (LFV), mehrere Arenaviren und als Schwann-Zell-Rezeptor für Mycobacterium leprae beschrieben worden (Rambukkana et al., 1998; Cao et al., 1998). Mycobacterium leprae bindet an α -Dystroglykan nur in Anwesenheit der G-Domäne der α -2-Kette von Laminin-2 (Rambukkana et al., 1998). Anderenfalls ist die Bindung des Bakteriums nicht möglich. Vermittelt durch DG stellt das Mycobacterium leprae eine Verbindung zum Zytoskelett her, die notwendig ist für die Ausbreitung der Erreger.

2.1.3. Das Myoepithel – ein regulärer Zelltyp der duktulo-lobulären Einheit der Mamma

Myoepitheliale Strukturen lassen sich als Teile des Stromas der Mamma und an Basalmembranen der Duktus und Lobuli und der Gefäße nachweisen. Mit Hilfe von glattmuskulärem Aktin (α -smooth-muscle-actin, ASMA) und Caldesmon sind myoepitheliale Zelle und Myofibroblasten darstellbar. Mit ASMA lassen sich Myofibroblasten von Fibroblasten des Bindegewebes unterscheiden (Skalli et al., 1986). Im gesunden Gewebe der Mamma findet man regulär myoepitheliale Zellen entlang der Basalmembran zwischen sekretorischen Zellen.

2.2. Die Bedeutung der Basalmembran für die Karzinominvasion

Die Invasion und das metastatische Potential maligner Tumoren hängen unter anderem von den Basalmembranstrukturen und ihren Barrierefunktionen ab. Das invasive, also basalmembrandurchbrechende Wachstum charakterisiert die maligne Neoplasie und bestimmt den Verlauf der Krankheit (Gould et al., 1980).

2.2.1. Die regulären Funktionen der Basalmembran

Basalmembranen sind ein spezifischer Teil der extrazellulären Matrix, der sich an Grenzflächen zwischen Zellen und Bindegewebe befindet. Es handelt sich um zellassoziierte Strukturen, welche die Gewebearchitektur aufrecht erhalten, die epithelialen Strukturen vom Bindegewebe trennen, eine selektiv permeable Barriere zwischen den Gewebekompartimenten darstellen und der Ligandenbindung dienen. Sie halten die zelluläre Homöostase aufrecht und sind bedeutsam für die Differenzierung und die Funktion vieler Zelltypen (Adam und Watt, 1993).

Die Basalmembran dient dabei als Haftfläche, sie beeinflusst die Differenzierung, das Wachstum und die Regenerierung und wirkt als Filtrationsschranke aufgrund ihrer selektiven Permeabilität. Diese Eigenschaften der BM sind von Bedeutung für das intakte physiologische Verhalten des gesamten Organs.

2.2.2. Funktionsverluste der Basalmembran

Dass eine gestörte Integrität der Basalmembranen zu Funktionsverlusten führt, konnte von Streuli und Mitarbeitern gezeigt werden (1995). Die Autoren konnten nachweisen, dass es zu Abbrüchen der BM während der Involution der Mamma kommt. Metalloproteasen führen zu Basalmembrandefekten, die die Apoptose der Milchgangsepithelien bzw. lobulären Epithelien induzieren. Diese Beobachtung zeigt, dass die BM essentiell für den Funktionserhalt der Mamma ist.

2.2.3. Strukturveränderungen der Basalmembran im Karzinom

Im Karzinom ist die Relation zwischen Epithelzellen und BM gestört. Die BM stellt eine schützende Barriere gegen die initiale Infiltration des Gewebes durch maligne Zellen dar (Albrechtsen et al., 1981). Das Initiieren der Kaskade der Metastasenentwicklung setzt eine Interaktion von Krebszellen und dem Gewebe, das den Primärtumor umgibt, voraus. Diese Interaktion ist erst nach Zerstörung der Basalmembran möglich. Die weiteren Schritte zur Metastasierung sind folgende: Gefäßinvasion, Lokomotion und Permeation von Tumorzellen, Festsetzung der entarteten Zellen im Zielorgan, Angiogenese und Wachstum der entstandenen Metastase (Landgraf et al., 1997).

Die initiale Phase spielt sich im tumornahem Wirtsgewebe ab, wo es zur Ausbildung eines Ödems kommt. Die Tumorzellen haben die Fähigkeit, Degenerationsenzyme (Kollagenase, Elastase, Plasminogenaktivator und viele andere) zu produzieren (Hart und Saini, 1992). Die BM wird besonders durch Kollagenase vom Typ IV und verschiedene Proteasen zerstört, so dass die genannten Defekte entstehen können (Liotta et al., 1984).

Durch die so geschaffene Auflockerung des Wirtsgewebes kommt die Fähigkeit der Tumorzellen zur aktiven Lokomotion zum Tragen. Die Krebszelle lagert sich an die physiologische Lücke zwischen zwei Endothelzellen an, löst die BM enzymatisch auf, durchwandert sie und wird mit dem strömendem Blut ausgeschwemmt.

Diskontinuitäten der BM in malignen Läsionen wurden bereits mehrfach beschrieben (Liotta et al., 1984; Raymond und Loeng, 1991). An Stellen der Mikroinvasion und in der Nähe von invasiv wachsenden Tumorzellen tritt ein deutlicher Verlust der Basalmembran auf (Liotta et al., 1984). Über die Bedeutung des zur intakten

Basalmembranstruktur gehörenden Laminin 2 im Prozess der Karzinomentstehung ist bislang nichts bekannt.

Wie eingangs erwähnt, ist Dystroglykan notwendig für die Integrität der Zellkomplexe und erweist sich als Bestandteil stabilisierender Strukturen. DG steht in direktem Kontakt zur Basalmembran und bindet Laminin-2. Die Strukturen bilden einen Teil der Barriere gegen die Tumorzellinvasion. Darum stellt sich die Frage, in welchem Zusammenhang das Vorhandensein beziehungsweise der Verlust von Dystroglykan und die Invasion eines Tumors stehen.

2.3. Histologische Diagnostik des Mammakarzinoms

Es sind verschiedene histologische Typen des Mammakarzinoms beschrieben worden: Das Carcinoma in situ (duktal und lobulär) sowie das invasiv duktales und das invasiv lobuläre Karzinom sind die wesentlichen Varianten.

Entsprechend der WHO-Klassifikation werden Mammakarzinome histopathologisch in nichtinvasive und invasive unterteilt (Wittekind und Wagner, 1997).

2.3.1. Nichtinvasive Karzinome der Mamma

Die nichtinvasiven Karzinome werden in Abhängigkeit von ihrer Differenzierung in zwei Gruppen gegliedert: die der intraduktalen Karzinome (DCIS) und die der intralobulären Karzinome (LCIS) (Silverstein et al., 1996).

2.3.2. Invasiv duktales und invasiv lobuläres Karzinom

Die Invasion eines Tumors bedeutet, dass Tumorzellen die Basalmembran durchbrechen. Das karzinomatöse Gewebe kann dabei seinen Ursprung in Zellen der Duktus (invasiv duktales Karzinom) oder der Lobuli (invasiv lobuläres Karzinom) haben. Ein invasives Mammakarzinom kann zudem eine spezielle Differenzierung aufweisen. Somit gibt es medulläre, muzinöse, papilläre adenoid-zystische und intrazystische Karzinome sowie Karzinome vom Basalzelltyp (Wittekind und Riede, 1995).

2.4. Dystroglykan und Laminin-2 im gesunden Brustgewebe und benignen und malignen Läsionen der Mamma

Die Expression von DG ist bisher weder im normalen adulten Gewebe der weiblichen Brust noch in benignen Läsionen der Mamma systematisch untersucht worden. Wenige Informationen gibt es zum Auftreten im Karzinom. Studien zur Expression von Laminin-2 in der normalen, weiblichen Brust liegen in der Literatur vor (Charpin et al., 1986; Durbeej et al., 1998; Damiani et al., 1999). Der Dystroglykan-Komplex als Rezeptor von Laminin-2 stellt einen interessanten Ansatzpunkt zur Charakterisierung von weiteren molekularen Strukturen des Mammagewebes dar, die im Zusammenhang mit der Entstehung eines Mammakarzinoms stehen könnte. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand deshalb der Vergleich des Auftretens von Dystroglykan und Laminin-2 im normalen, adulten Mammagewebe und im Mammakarzinom der Frau.

2.5. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Die vorangehend beschriebene Bedeutung des Dystroglykans für die Zellintegrität und die Zellstabilität und seine modulierenden Eigenschaften bezüglich der Morphogenese, der Differenzierung und der Proliferation ließen erwarten, dass Untersuchungen zur Expression dieses Glykoproteins auf die Dignität und die Prognose von Neoplasien der Mamma schließen lassen können. Da Dystroglykan mit Strukturen assoziiert ist, die die Karzinominvasion verhindern, lässt sich vermuten, dass der Malignitätsgrad von Karzinomen mit der zu erkennenden Dystroglykandeposition im Gewebe korreliert.

Daher waren die qualitative und quantitative Bewertung der Verteilung von Dystroglykan im Mammakarzinom Untersuchungsziel dieser Arbeit. Durch die Analyse der möglichen Korrelation zwischen der Proteindeposition und dem Grading und der Metastasierung sollte die diagnostische beziehungsweise prognostische Bedeutung von Dystroglykan als Marker für die Malignität eines Mammakarzinoms überprüft werden.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. In wie weit sind Laminin-2 und Dystroglykan regelmäßige Bestandteile normalen Epithels der Mamma?

2. Untersuchungen der Präparate von Mammagewebe bzw. Tumorgewebe der weiblichen Brust hinsichtlich weiterer Charakteristika: Tumorzelltyp, Grading, Tumorausbreitung zum Operationszeitpunkt (TNM-Klassifikation).
3. Welche Veränderungen sind in benignen Neoplasien und in nicht-invasiven und invasiven Karzinomen der weiblichen Brust bezüglich des Verteilungsmusters der Glykoproteine nachweisbar? Durch die quantitative und qualitative Beschreibung des Verteilungsmusters von Dystroglykan und Laminin-2 und den Vergleich der Expression mit Daten der Literatur sollte der Verluste von Laminin-2 und Dystroglykan näher charakterisiert werden.
4. Analyse des Verteilungsmusters von Dystroglykan und Laminin-2 im Vergleich zu prognostischen Parametern: Korrelation von Dystroglykan und von Laminin-2 und dem Grading und der nodalen Metastasierung der Karzinome.
5. Überprüfung des Vorkommens von myoepithelialen Strukturen (ASMA und Caldesmon) und qualitative Beschreibung ihres Verteilungsmusters im Vergleich zu DG und Laminin-2.

3. Material und Methoden

3.1. Klinische Parameter

3.1.1. Patientengut der Untersuchung

90 Patientinnen mit Veränderungen der Brust wurden in die Studie einbezogen. 10 benigne Veränderungen (Fibrosen, Mastitiden, Papillome, Duktusproliferationen und Narbengewebe), 11 duktale Carcinoma in situ (DCIS), 15 invasiv lobuläre und 54 invasiv duktale Karzinome der Mamma wurden ausgewertet. Die Diagnosen der einzelnen Patientinnen wurden histologisch (HE-Schnitt) gestellt.

Alle Gewebeproben stammen aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe und dem Pathologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Präparate wurden im Zeitraum von 1993 bis 1998 angefertigt.

3.1.2. Ausbreitung des Primärtumors nach TNM-Klassifikation

Die Ausbreitung des Primärtumors wurde anhand der TNM-Klassifikation (Tab. 3) beurteilt:

Tab. 3: TNM-Klassifikation der Mammakarzinome (Wittekind und Wagner, 1997).

Primärtumor (T, pT)	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Tumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ, intraduktales Karzinom, intralobuläres Karzinom, M. Paget der Mamille
T1	Tumor \leq 2 cm (größter Tumordurchmesser)
T1a	< 0,5 cm
T1b	0,5 – 1 cm
T1c	1 – 2 cm
T2	2 – 5 cm
T3	> 5 cm
T4	Tumor beliebiger Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand/Haut
T4a	Ausdehnung auf die Brustwand
T4b	Hautödem, Ulzeration der Haut, Satellitenmetastasen in der Haut der

	ipsilateralen Brust
T4c	T4a und T4b
T4d	Inflammatorisches Karzinom
Regionäre Lymphknoten, klinisch nachgewiesen (N)	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
N2	Metastasen ipsilateral axillär fixiert
N3	Metastasen in ipsilateralen Mammaria interna Lymphknoten
Regionäre Lymphknoten, im histologischen Präparat nachgewiesen (pN)	
PNx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
PN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
PN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
PN1a	Mikrometastasen $\leq 0,2$ cm
PN1b	Mikrometastasen ≤ 2 cm
bi	Metastasen in 1 – 3 Lymphknoten, alle < 2 cm
bii	Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten, alle < 2 cm
biii	Ausbreitung einer Metastase (< 2 cm) durch die Kapsel
biv	Lymphknotenmetastase ≥ 2 cm (in größter Ausbreitung)
PN2	Metastasen ipsilateral axillär fixiert
PN3	Metastasen in ipsilateralen Mammaria interna Lymphknoten
Fernmetastasen (klinisch (M) bzw. im histologischen Präparat (pM) nachgewiesen)	
Mx	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (einschließlich supraklavikulärer Lymphknoten)

Bei den 11 nicht invasiven Karzinomen (DCIS) überschritt der Primärtumor die Basalmembran nicht. Es lag keine nodale Metastasierung vor.

Die invasiven Karzinome zeigten die in Tab. 4 angegebenen Ausbreitungsstadien. Bei 5 invasiv duktalem Karzinomen lagen keine Angaben über den Ausbreitungsgrad vor.

Tab.4: Verteilung der invasiven Karzinome (Primärtumor, pT-Stadium).

Kategorie des Primärtumors	Invasiv duktile Karzinome (Fallzahl = n)	Invasiv lobuläre Karzinome (Fallzahl = n)
pT1a	n = 1	
pT1b	n = 7	n = 1
pT1c	n = 20	n = 9
pT2	n = 19	n = 4
pT4	n = 1	
pT4b	n = 1	n = 1
Summe	n=49	n=15

Die Lymphknotenmetastasierung der invasiven Karzinome ist in Tab. 5 dargestellt. Bei 22 invasiv duktilen und 5 invasiv lobulären Karzinomen lagen keine Angaben über den Grad der nodalen Metastasierung vor.

Tab. 5: Verteilung der lymphatischen Metastasen (N-Stadium).

Lymphknotenmetastasierung	Invasiv duktile Karzinome (Fallzahl = n)	Invasiv lobuläre Karzinome (Fallzahl = n)
pN0	n = 19	n = 6
pN1	n = 1	n = 1
pN1b		n = 1
pN1bi	n = 5	n = 1
pN1bii	n = 2	
pN1biii	n = 5	
pN2		n = 1
Summe	n=32	n=10

3.2. Tumormaterial

3.2.1. Paraffineinbettung und konventionelle Histologie

Eine Serie von parallelen sagittalen Schnitten im Abstand von 1 bis 2 cm wurde aus dem Tumormaterial angefertigt. Nach anschließender Fixation in 4%igem gepuffertem Formalin wurde das Gewebe in 0,5 cm dicke Scheiben lamelliert und in

Paraffin eingebettet. Die konventionelle HE-Färbung erfolgte an 4µm dicken Serienschnitte des angefertigten Materials.

3.2.2. Kryokonservierung für immunhistochemische Verfahren

Das Tumormaterial wurde unmittelbar nach der Operation bzw. Obduktion in 4°C kalte sterile HANK'Salzlösung (HBSS, ohne Kalzium und ohne Magnesium; Gibco BRL, Research Products, Life Technologies Inc., USA) überführt und unter sterilen Bedingungen präpariert. 5x5x5 mm große Proben wurden in stickstoffgekühltem Propan schockgefroren und bei -70°C steril gelagert (Tiefkühltruhe UF 85-460 T, Colora Messtechnik GmbH, BRD). Zur Vermeidung einer gefrierbedingten Schrumpfung des Gewebes erfolgte eine Vorbehandlung der Proben in TISSUE-TEK (Miles Inc., Diagnostics Division, Elkhart, USA).

3.3. Immunhistochemische Technik

3.3.1. Aufbereitung des Gewebematerials für immunhistochemische Verfahren

Die verwendeten Kryostatschnitte der entsprechenden Gewebeproben, die mit β -Dystroglykanantikörpern und Antikörpern gegen die α 2-Kette des Laminins markiert werden sollten, wurden 10 Minuten lang in Azeton fixiert. Die Fixierung der Schnitte, denen die ASMA- beziehungsweise Caldesmonantikörper zugesetzt werden sollten, erfolgte 10 Minuten lang nach dem Schema von Zambodi (siehe 2.3.5.). Die Fixierung wurde durch Zugabe von Ziegennormalserum gestoppt (Nährlösung, RPMI, TRIS). Die Acetonfixierung führt zu einer geringeren Kernfärbung.

3.3.2. Primäre Antikörper

Primäre Antikörper wurden gegen folgende Antigene eingesetzt: Dystroglykan (β -Untereinheit), α 2-Kette von Laminin-2, sowie ASMA und Caldesmon. Die Spezifität der applizierten Antikörper ist aus dem Schrifttum bekannt. Spezifität, Verdünnungen, Herkunft und Literaturquellen sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tab. 6: Spezifität, Verdünnung, Herkunft und Referenzen der applizierten Antikörper.

Antigen	Klon	Verdünnung	Herkunft	Referenz
β-Dystroglykan	43DAG1/ 8D5	1:100	Laboratories Novo Castra, Dänemark	Bewick et al., 1993; Cullen et al., 1994
Laminin-2	2H5	1:2000	Gibco BRL, Research Products, Life Technologies, Inc., USA	Engvall et al., 1990
ASMA	1A4. (1)	1:80	Dako A/S, Dänemark	Skalli et al., 1986, 1989a, 1989b; Ronnov- Jessen et al., 1990; Hasegawa et al., 1990; Schmitt-Gräff et al., 1991
Caldesmon	TD107	1:100	Laboratories Novo Castra, Dänemark	Lin et al., 1988

3.3.3. APAAP-Methode

Die APAAP-Methode (Alkalische - Phosphatase - Anti - Alkalische - Phosphatase) zum immunhistochemischen Nachweis spezifisch im Gewebe gebundener primärer Antikörper wurde in folgender Weise durchgeführt: Die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (Verdünnung der Antikörper in Verdünnungslösung für Primärantikörper, siehe 3.3.5.) erfolgte über Nacht bei einer Temperatur zwischen 4° und 6°C. Danach wurde Kaninchen-anti-Maus-Serum (Dako A/S, Dänemark, Verdünnung 1:70 in Verdünnungspuffer für Brückenantikörper, siehe 3.3.5.) für 45 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt. Im Anschluß daran erfolgte ebenfalls 45 Minuten lang bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem APAAP-Komplex (Alkalische - Phosphatase - Anti - Alkalische Phosphatase, Dako A/S, Dänemark, Verdünnung 1:70 in Verdünnungspuffer für den APAAP-Komplex, siehe

3.3.5.). Diese beiden Behandlungsschritte geschahen als Doppelbestimmung, um die Sensitivität der Methode zu steigern. Mit TRIS-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, siehe 3.3.5.) wurden die Schnitte nach jedem Inkubationsschritt gründlich gespült. Die Farbreaktion für den lichtmikroskopischen Nachweis von gebundener alkalischer Phosphatase, erfolgte nach Zugabe von Naphtol-AS-BI-Phosphat/Neufuchsin (Entwicklungslösung, siehe 3.3.5.). Zur Blockierung der endogenen Enzymaktivität wurde der Entwicklungslösung 0,25 mmol Levamisol (Sigma, BRD) zugesetzt. Anschließend wurden die Schnitte gründlich mit Leitungswasser gespült und in Glycerol/Gelatine eingedeckt. Die Gegenfärbung der Kerne wurde mit Haematoxinilin (nach Meyer) durchgeführt. Bei Zimmertemperatur wurde zwischen 3 und 10 Minuten gegengefärbt. Um die Anfärbung zu verstärken, wurde dieser Vorgang wiederholt.

3.3.4. Immunhistochemische Kontrollen

Zur Bewertung der Immunreaktion wurde der primäre Antikörper durch nichtimmunes Serum als Negativkontrolle ersetzt.

3.3.5. Verzeichnis der Puffer-, Farb- und Fixierlösungen

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte wurden die in Tabelle 7 zusammengestellten Substanzen zur Färbung und Fixierung der Präparate verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen, BRD) bezogen.

Tab. 7: Verzeichnis der verwendeten Substanzen.

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	8g NaCl 0,2g KCl 1,15g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 0,2g KH ₂ PO ₄ auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen
TBS (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung)	2,25g TRIS/Base 17,125g TRIS/HCl 21,95g NaCl auf 2500ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,4-7,6

Fixierlösung nach Zamboni	150ml gesättigte wäßrige Pikrinsäure mit 20g Paraformaldehyd mischen bei 60°C, tropfenweise neutralisieren mit 2,5%iger NaOH, filtrieren und auf 1000ml mit PBS auffüllen
1.Puffer für den APAAP-Komplex	
TRIS-Puffer	0,45g TRIS/Base 3,425g TRIS/HCl 0,5g Natriumazid auf 500ml mit Aqua dest. auffüllen
Verdünnungslösung für Primärantikörper	10% (v/v) RPMI-Medium in TRIS-Puffer 1%(w/v)Rinderserumalbumin (Trockensustanz) pH 7,4
Verdünnungslösung für Brückenantikörper	10% (v/v) RPMI-Medium in TRIS-Puffer 10% (v/v) inaktiviertes Humanserum
Verdünnungslösung für APAAP-Komplex	10% (v/v) RPMI-Medium in TRIS-Puffer
2.Entwicklungslösung	
Entwicklungslösung (100ml Ansatz)	70ml Entwicklungspuffer 25ml Propandiollösung 40mg Levamisol 500µl Na-Nitritlösung 135µl Neufuchsinlösung 600µl Naphtol-AS-BI-Phosphatlösung auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen
Entwicklungspuffer	34,8g NaCl 6,0g TRIS/Base 19,6g TRIS/Base auf 700ml Aqua dest. auffüllen
Propandiollösung	21g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol auf 1l Aqua dest. auffüllen
Na-Nitritlösung	30mg Na-Nitrit auf 1ml Aqua dest. auffüllen
Neufuchsinlösung	5g Neufuchsin auf 100ml 2N HCl auffüllen
Naphtol-AS-BI-Phosphatlösung	350mg Naphtol-AS-BI-Phosphat auf 6ml DMF auffüllen

3.4. Typisierung der Tumoren der Mamma

Die histologische Einteilung der Gewebeschnitte erfolgte nach Zellmuster, stromalen Veränderungen, Kerngrad, Polymorphien und Mitosen.

3.4.1. Typisierung der benignen Veränderungen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten 10 gutartigen Veränderungen der weiblichen Brust handelte es sich um Fibrosen, Mastopathien, Mastitiden, Duktuspapillome und Fibroadenome (nach Bässler, 1997).

3.4.2. Typisierung der malignen Veränderungen

Die 11 Carcinoma in situ (DCIS) sowie die 54 invasiv duktales und die 15 invasiv lobulären Karzinome wurden entsprechend ihres Differenzierungsgrades in Gruppen (siehe Anhang) eingeteilt (nach Bässler, 1997).

Die Prognose eines Tumors hängt entscheidend vom Differenzierungsgrad der Zellen ab. Die jeweiligen Paraffinschnitte waren die Grundlage für das Grading der Tumoren. Der Malignitätsgrad der invasiv duktales Karzinome wurde in Anlehnung an Bloom und Richardson (1957) beurteilt. Invasiv lobuläre Karzinome wurden unter Zuhilfenahme der Angaben von Sinn und Mitarbeitern ausgewertet (Sinn et al., 1997).

3.5. Bewertungskriterien der Immunreaktion (Scoring)

Bei 40-facher Objektvergrößerung (Mikroskop: Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurden jeweils 10 repräsentative Meßfelder pro Präparat ausgewählt und die mittlere Anzahl immunhistochemisch markierter Bereiche im Verhältnis zur gesunden Verteilung im Brustgewebe prozentual angegeben.

Um die Präparate vergleichen zu können, wurden sie in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Die Vollständigkeit der Basalmembranstrukturen und die Dichte des Rezeptorbesatzes wurden als Unterscheidungskriterien herangezogen (nach: D'Ardenne et al., 1991; Lipponen et al. 1994; Friedrichs et al. 1995).

Es wurden folgende vier Kategorien gebildet:

Für **Dystroglykan** galt die Einteilung:

- 3 - Vollständiger Rezeptorbesatz
- 2 - Rezeptorverluste < 10% des Umfangs der Duktus und Lobuli
- 1 - Rezeptorverluste zwischen 10 und 90% des Umfangs der Duktus und Lobuli
- 0 - Rezeptorverluste > 90% des Umfangs der Duktus und Lobuli

Für **Laminin-2** galt die Unterteilung:

- 3 - Vollständige BM-Strukturen
- 2 - BM-Defekte mit Verlusten < 10% des Umfangs der Duktus und Lobuli
- 1- BM-Defekte mit Verlusten zwischen 10 und 90% des Umfangs der Duktus und Lobuli
- 0- BM-Defekte mit Verlusten > 90% des Umfangs der Duktus und Lobuli

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen den semiquantitativ bewerteten Glykoproteindepositionen und dem jeweiligen Kerngrad der Carcinoma in situ, der invasiv duktalem und invasiv lobulärem Karzinom sowie der eingetretenen nodalen Metastasierung der invasiv duktalem und invasiv lobulärem Karzinom wurde mit dem exakten Test nach Fisher (Glantz, 1997) durchgeführt, um so eine Abhängigkeit auf einem Signifikanzniveau von $\alpha < 5\%$ (zweiseitige Fragestellung) zu überprüfen. Vorteil des exakten Fisher-Tests ist seine Anwendbarkeit bei einer kleinen Anzahl von Patienten (bei erwarteten Häufigkeiten unter 5).

Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 10.0 für Windows (Microsoft, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden normales Brustgewebe sowie benigne und maligne Veränderungen der weiblichen Brust bezüglich des Vorkommens von β -Dystroglykan und Laminin-2 untersucht. Myoepitheliale Zellen (mit ASMA und Caldesmon angefärbt) wurden vergleichend betrachtet. Die Expression der einzelnen Proteine wurde mit dem Grading der Tumoren und dem Status der nodalen Metastasierung korreliert.

4.1. Qualitative Analyse des Auftretens von β -Dystroglykan und Laminin-2 im Gewebe der Mamma

Das Vorkommen von β -Dystroglykan und Laminin-2 wird im folgenden qualitativ beschrieben. Dabei wurde lediglich das Vorhandensein und die spezifische Verteilung beider Glykoproteine erfasst.

4.1.1. Gesundes Brustgewebe

Um Kontrollwerte zu ermitteln, wurde zunächst das Auftreten der Glykoproteine β -Dystroglykan und Laminin-2 im Gewebe der gesunden Mamma bestimmt.

4.1.1.1. β -Dystroglykan im Gewebe der normalen, adulten weiblichen Brust

In jedem der untersuchten Präparate fand sich in allen Abschnitten der gesunden Brust eine positive, regelmäßige und kontinuierliche β -Dystroglykandarstellung, die eine Fokussierung zur Basalmembran hin aufwies (Abb. 4 und 5; vergleichen Myoepithelium in Abb. 6 und 7). Das intensivste Muster der Anfärbung zeigte sich in Regionen, in denen ein Kontakt der Milchdrüsenzellen zu Zellen der Basalmembran bestand. In den einzelnen Präparaten konnte kein Intensitätsunterschied im Bereich der Basalmembranen festgestellt werden. Im gesunden Brustgewebe war β -Dystroglykan an der der Basalmembran zugewandten Seite aller Basalzellen der Duktus und der Lobuli intensiv angefärbt. Es stellten sich somit vollständige rote, scharf konturierte Ringe dar, die die Duktus und Lobuli einheitlich und vollständig umgaben. Unterbrechungen dieser Zirkumferenz wurden nicht gefunden. Eine

weniger deutliche, aber dennoch vollständige Anfärbung ließ die dem Lumen der Duktus und Lobuli zugewandte Seite der Basalzellen erkennen. Das Zytoplasma der Luminalzellen und die Zellmembran der Luminalzellen zeigten keine Anfärbung. Intensitätsunterschiede in der Immunmarkierung zwischen Duktus und Lobuli ließen sich nicht nachweisen. Ein Vorkommen von β -Dystroglykan unabhängig der Drüsenstrukturen im Stroma war nicht vorhanden.

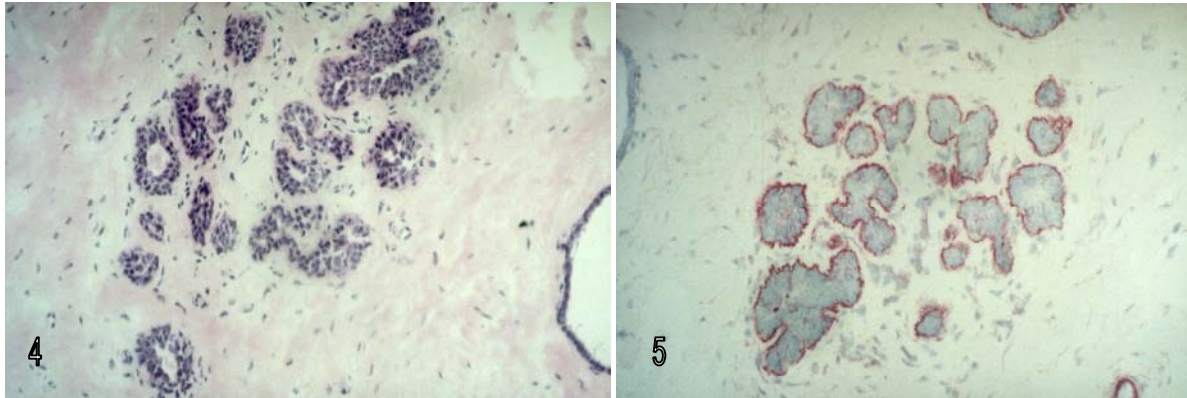


Abb.4: Ausschnitt einer Übersichtsfärbung mit HE (links), Darstellung einer Gruppe peripherer Milchgänge, Objektivergrößerung x20.

Abb.5: Immunhistochemische Darstellung von Dystroglykan mittels APAAP-Technik (rechts) an einer Gruppe peripherer Milchgänge (Objektivergrößerung x20). Die kontinuierliche Anfärbung entlang der basalen Seite der Zellen entspricht Score 3.

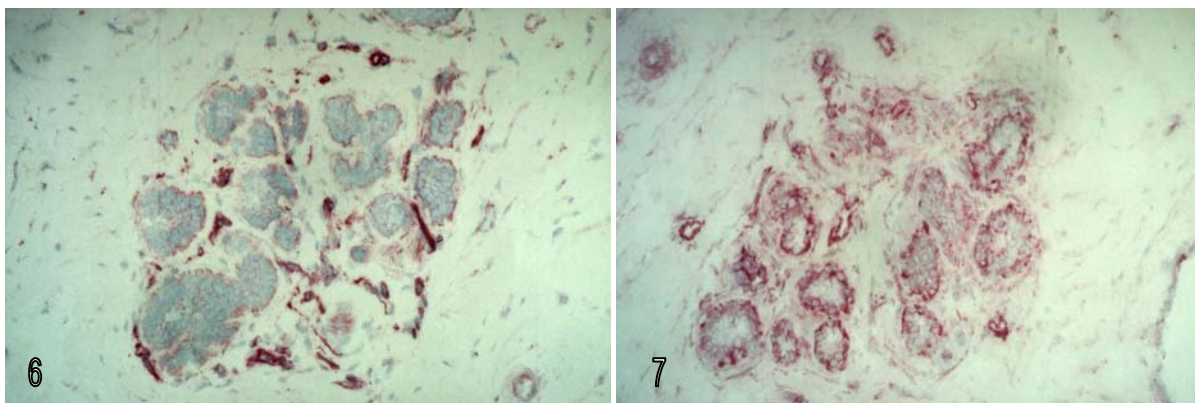


Abb. 6 und 7: Immunhistochemischer Nachweis myoepithelialer Zellen mittels Antikörpern gegen glattmuskuläres Aktin (ASMA, links) und gegen Caldesmon (rechts), APAAP-Technik, Objektivergrößerung x20. Die regelmäßige Anfärbung von myoepithelialen Zellen entlang der Basalmembran entspricht Score 3. Anfärbung stromaler Zellen. Darstellung von myoepithelialen Zellen an den Basalmembranen der Blutgefäße.

4.1.1.2. Laminin-2 im Gewebe der normalen, adulten weiblichen Brust

Laminin-2 als Protein der Basalmembran war ebenso ringförmig und kontinuierlich um Duktus und Lobuli der Brustdrüse positioniert. Hierbei waren basalmembranwärts gerichtete Zellmembranen der Basalzellen deutlich abzugrenzen. Alle epithelialen

Basalmembranen der Duktus und Lobuli zeigten eine vollständige, intensiv rot gefärbte Zirkumferenz, die keine Abbrüche aufwies. Aber auch an Basalmembranen der Gefäße ließ sich die Färbung von Laminin-2 strukturiert erkennen. Eine Umsäumung der gefäßassoziierten Basalmembran stellte sich dar. Ein Auftreten von Laminin-2 unabhängig von Basalmembranen im Stroma ließ sich nicht nachweisen.

4.1.2. Atrophische Bereiche und Zysten der Brust

In atrophischen Bereichen und in zystischen Veränderungen der weiblichen Brust konnten keine Veränderungen in Form von Zu- oder Abnahme der Deposition von β -Dystroglykan und Laminin-2 festgestellt werden. Beide Proteine lagen in gleicher Weise vor wie im gesunden, nicht-atrophischen und nicht-zystischen Gewebe. An allen Basalmembranen ließen sich ringförmige Strukturen erkennen, die nur durch Anfärbung der basalen Zellen entstand. Die Verteilung entsprach dem oben beschriebenen Auftreten im gesunden Gewebe.

4.1.3. Benigne Veränderungen der Brust

In den untersuchten benignen Veränderungen der weiblichen Brust war die Anordnung von β -Dystroglykan und Laminin-2 (Abb. 8, 9 und 10 ; zum Vergleich Myoepithelium in Abb. 11) in der Mehrzahl der Fälle unverändert im Vergleich zur gesunden Brust. β -Dystroglykan und Laminin-2 stellten sich in den meisten Präparaten streng ringförmig an die Basalmembran assoziiert dar. Es ließen sich keine stromalen Vorkommen nachweisen.

In zwei von zehn Fällen konnte ein geringfügiger Verlust von β -Dystroglykan nachgewiesen werden, das heißt, dass es Unterbrechungen der in der gesunden Brust normalerweise zirkulär gefärbten Strukturen gab.

Laminin-2 war in vier von zehn Fällen auch weniger intensiv gefärbt. Unterbrechungen der ringförmig gefärbten Strukturen ließen sich erkennen. Sowohl die Intensität als auch die Lokalisation beider Proteine ist dennoch weitgehend der der gesunden Brust ähnlich.

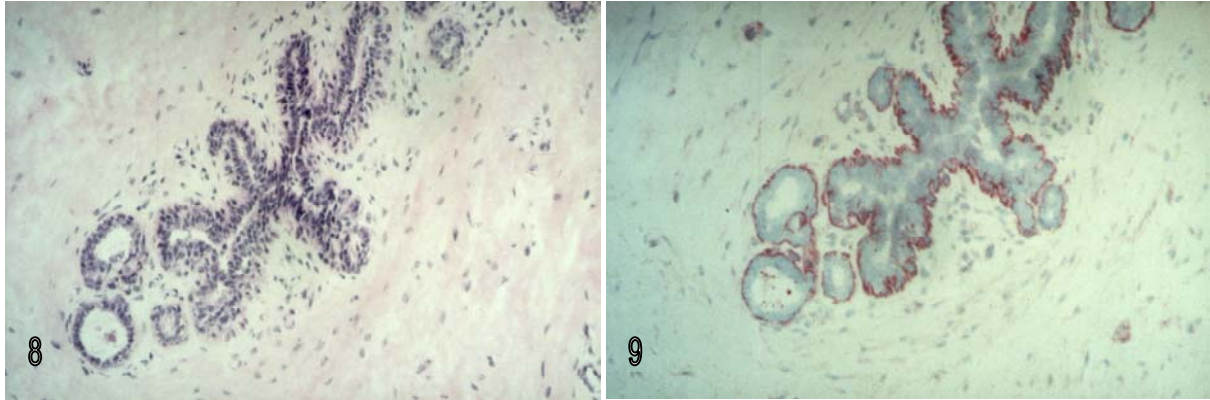


Abb.8: Ausschnitt immunhistochemischer Übersichtsfärbung mit HE (links) zur Darstellung einer benignen intraduktalen Proliferation des Epithels (Objektivvergrößerung x10).

Abb.9: Immunhistochemische Darstellung von Dystroglykan mittels APAAP-Technik (rechts) bei benigner Duktusproliferation (Objektivvergrößerung x10). Kontinuierliche Anfärbung des Rezeptors an der basalen Seite der epithelialen Zellen (entspricht Score 3).

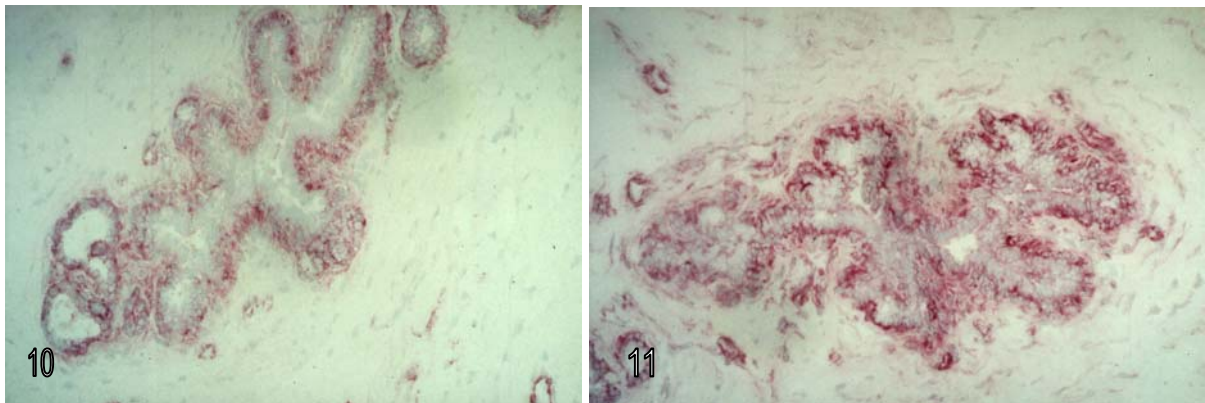


Abb.10: Immunhistochemische Darstellung von Laminin-2 mittels APAAP-Technik (links) bei benigner Duktusproliferation (Objektivvergrößerung x10). Regelmäßige, ununterbrochene Anfärbung des Protein an Zellstrukturen, die der Basalmembran anliegen (entspricht Score 3). Darstellung von myoepithelialen Zellen an der Basalmembran der Blutgefäße.

Abb.11: Immunhistochemische Darstellung von myoepithelialen Strukturen mittel Antikörpern gegen Caldesmon unter Verwendung der APAAP-Technik (links) bei benigner Duktusproliferation (Objektivvergrößerung x10). Kontinuierliche Anfärbung der epithelialen Zellen, die der Basalmembran anliegen (entspricht Score 3). Darstellung von myoepithelialen Zellen an der Basalmembran der Blutgefäße.

4.1.4. Carcinoma in situ der Brust (DCIS)

Im folgenden wurden das bereits als malignes Wachstum einzustufende Carcinoma in situ auf das Vorkommen von β -Dystroglykan und Laminin-2 untersucht.

4.1.4.1. β -Dystroglykan im DCIS

Die Carcinoma in situ zeigten einen deutlichen Verlust von β -Dystroglykan. Die Anfärbung des Glykoproteins war unregelmäßig (Abb. 12 und 13). Es ließen sich keine deutlichen ringförmigen Strukturen wie in der gesunden Brust erkennen. Eine Abnahme der Anfärbbarkeit, aus der Unterbrechungen der in der gesunden Brust scharf konturierten, ringförmigen Umrandung der Duktus und Lobuli resultierten, war erkennbar. Andererseits ließ sich eine intrazelluläre Zunahme der Farbtintensität im Bereich der Basal- und Luminalzellen der duktaalen und lobulären Strukturen feststellen. Weiterhin wurde eine diffuse Zunahme von β -Dystroglykan im Stroma gefunden.

4.1.4.2. Laminin-2 im DCIS

Das Carcinoma in situ wies auch eine Abnahme des Lamininergehalts auf, so dass es ebenfalls zu Unterbrechungen der Anfärbung der Basalmembranen kam (Abb. 14; zum Vergleich Myoepithel, Abb. 15). Ringförmige Anfärbungen der Basalmembranen waren nicht mehr vorhanden. Es ließ sich eine intrazelluläre Zunahme der Anfärbung von luminalen und basalen Zellen feststellen. Diese zelluläre Retention von Laminin-2 fand sich in allen Präparaten. Der Lamininergehalt nahm diffus im Stroma zu.

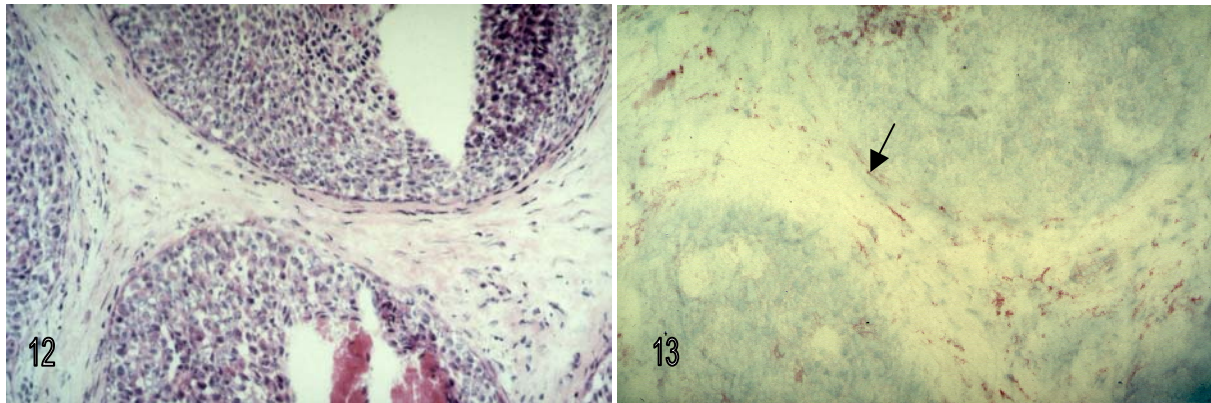


Abb.12: Ausschnitt einer Übersichtsfärbung mit HE (links) eines intraduktalen Karzinoms der Mamma (DCIS), Objektivergrößerung x20. Es zeigen sich die nukleäre Hyperchromasie, die Pleomorphie der tumorösen Zellen und Nekrosen.

Abb.13: Immunhistochemischer Nachweis von Dystroglykan mittels APAAP-Technik (rechts) im intraduktalen Mammakarzinom (DCIS), Objektivergrößerung x20. Darstellung des Rezeptors in sehr geringem Maße an epithelialen Zellen, die der Basalmembran zugewandt sind (entspricht Score 1).

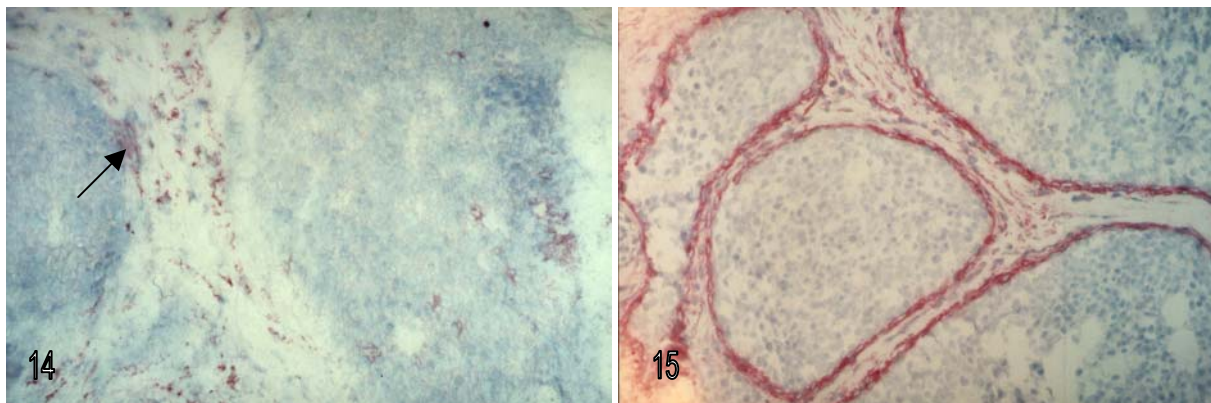


Abb.14: Immunhistochemische Darstellung von Laminin-2 (links) im intraduktalen Karzinom der Mamma (DCIS) mittels APAAP-Technik, Objektivergrößerung x20, Nachweis des Liganden in nur sehr geringem Maße möglich (entspricht Score 0).

Abb.15: Immunhistochemische Markierung mittels APAAP-Technik von myoepithelialen Zellen (rechts) unter Verwendung eines Antikörpers gegen glattmuskuläres Aktin (ASMA) im intraduktalen Karzinom (DCIS, Objektivergrößerung x20). Deutliche Darstellung in Zellen, die der Basalmembran zugewandt sind (entsprechend Score 3). Anfärbung myoepithelialer Strukturen im Stroma.

4.1.5. Invasive Karzinome der weiblichen Brust

Das Vorkommen von β -Dystroglykan und Laminin-2 in invasiven malignen Veränderungen wird im Folgenden detailliert beschrieben.

4.1.5.1. β -Dystroglykan in invasiv duktalem Karzinom

β -Dystroglykan wies im invasiv duktalem Karzinom eine erheblich verminderte Expression auf (Abb.16, 17, 20, 21). Die zirkuläre Anordnung von β -Dystroglykan um die Duktus herum ist unterbrochen oder nahezu komplett aufgehoben. Das Glykoprotein ließ extensive, multifokale Verluste seiner Expression erkennen. Lediglich fragmentartig war es im Bereich der Basalmembranen angefärbt. Andererseits fand sich eine Zunahme des β -Dystroglykangehaltes im intrazellulären Bereich. Nicht nur basale Zellen der Duktus waren, im Gegensatz zur gesunden Brust, β -Dystroglykan-positiv, sondern auch luminale Zellen. Sowohl die Zellmembranen als auch das Zytoplasma stellten sich unterschiedlich intensiv rot gefärbt dar. Es ließ sich eine diffuse Anreicherung von β -Dystroglykan im fibrösen Stroma erkennen, also auch in Bereichen, die in der gesunden Brust und in benignen Veränderungen frei von β -Dystroglykan sind.

Die proliferierenden Tumorzellekonglomerate des invasiv duktalem Karzinoms zeigten eine Anfärbung des Dystroglykans im Bereich eingewachsener stromaler Zellen.

4.1.5.2. Laminin-2 in invasiv duktalem Karzinom

Erhebliche Veränderungen in der Lokalisation der Anfärbung des Proteins wurden im invasiv duktalem Karzinom deutlich. Es zeigten sich Unterbrechungen der Lamininfärbung im Bereich der Basalmembran (Abb.18 und 22; Myoepithel vergleichend in Abb.19 und 23). Ausgeprägte Verluste waren in jedem Präparate zu erkennen bis hin zur vollständigen Aufhebung der Anfärbung des Proteins. Laminin-2 stellte sich nur noch fragmentartig im Basalmembranbereich dar. Eine zunehmende Anfärbung Laminins im Bereich von luminalen Zellen war erkennbar.

Stromazellen waren aufgrund des erhöhten Laminingehaltes rot gefärbt und unterschieden sich dadurch deutlich vom Gewebe der gesunden Brust.

Größere Konglomerate von Tumorzellen wiesen ein spotartiges Lamininvorkommen in den zwischen ihnen gewachsenen stromalen Zellen auf.

4.1.5.3. β -Dystroglykan und Laminin-2 in invasiv lobulären Karzinomen

Die Deposition beider Proteine war mit der in invasiv duktalem Karzinom vergleichbar. Eine vollständige Anfärbung konnte in keinem der Präparate gefunden werden. Teils zeigte sich ein fragmentartiges Vorkommen, teils waren in den Präparaten beide Proteine nicht mehr nachweisbar.

Zellen im fibrösen Stroma und Zellen innerhalb von Tumorzellkonglomeraten waren durch die Immunmarkierung für DG und Laminin-2 jeweils rot angefärbt.

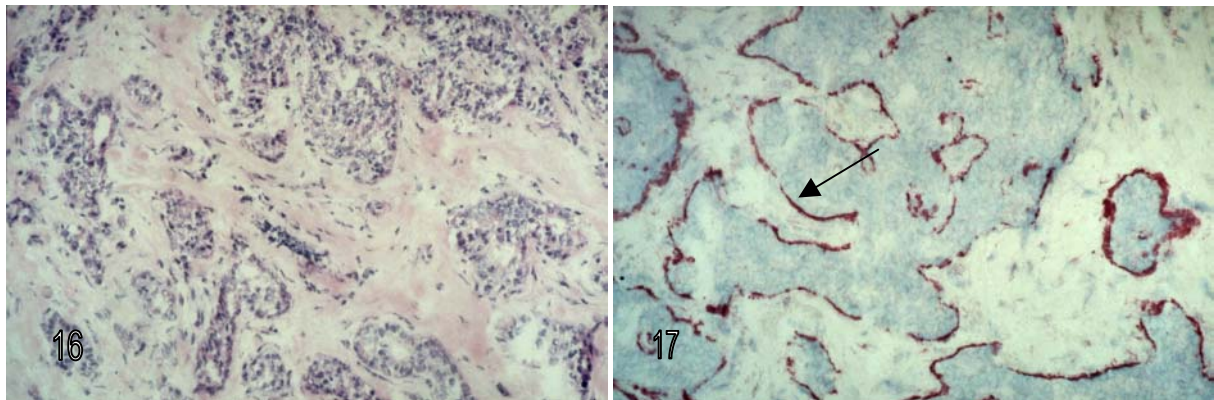


Abb.16: Ausschnitt der immunhistochemischen Übersichtsfärbung mit HE (links) eines invasiv duktalem Karzinoms der Mamma, Objektvergrößerung x20, gut differenziert (G 1). Tumorzellen gang- und nestartig angeordnet.

Abb.17: Immunhistochemische Darstellung von Dystroglykan mittels APAAP-Technik (rechts) im invasiv duktalem Karzinom der Mamma (Objektivvergrößerung x20). Unterbrochene Anfärbung der basalen Epithelzellen (Pfeil), die der Basalmembran zugewandt sind (entspricht Score 2). Das Vorkommen von Dystroglykan ist analog zum Auftreten der myoepithelialen Strukturen (siehe Abb. 15).

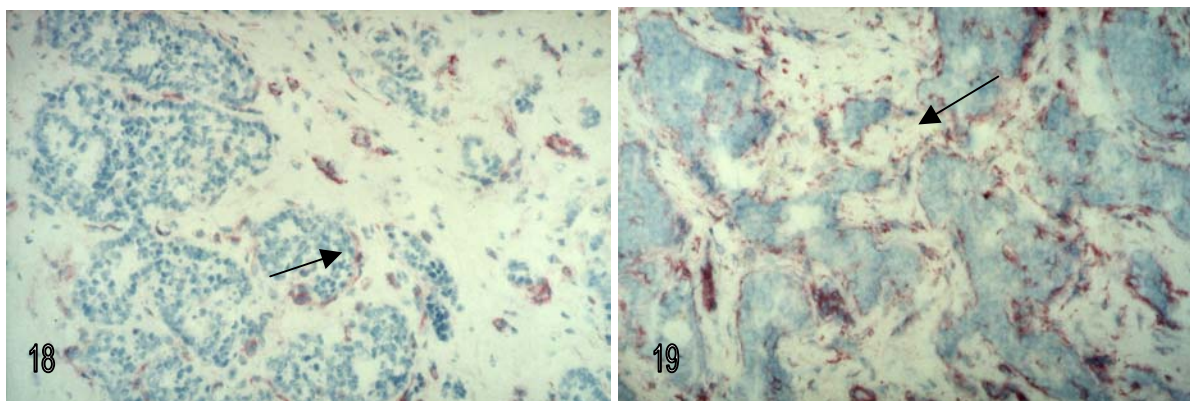


Abb.18: Immunhistochemische Darstellung von Laminin-2 mittels APAAP-Methode (links) im invasiv duktalem Karzinom der Mamma (Objektivvergrößerung x20), diskontinuierliche Anfärbung des Proteins an der Basalmembran (Pfeil), entspricht Score 2.

Abb.19: Nachweis myoepithelialer Strukturen im invasiv duktalem Karzinom der Mamma (rechts) mittels Antikörpern gegen glattmuskuläres Aktin (ASMA) mit APAAP-Technik, Objektvergrößerung x20, geringgradiges Vorkommen entlang der Basalmembran (Score 2). Anfärbung von myoepithelialen Zellen im Stroma (Pfeil).

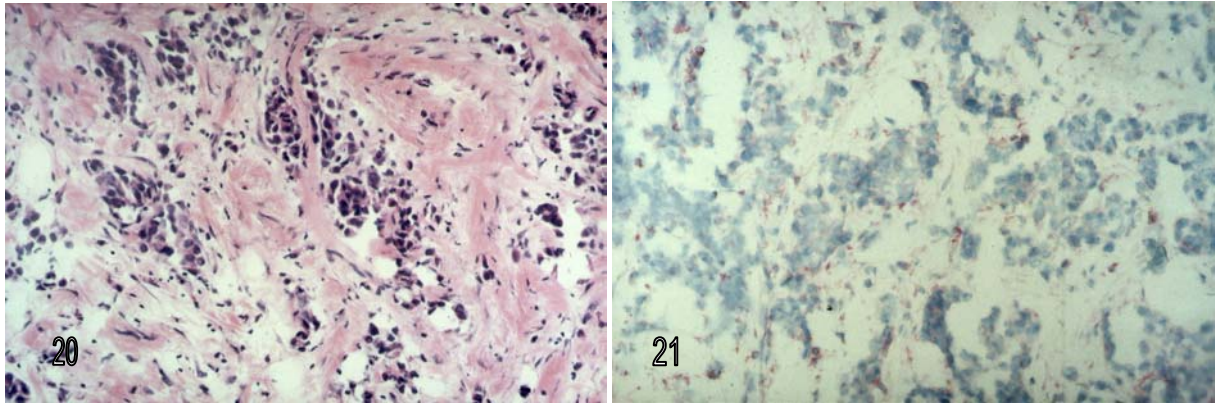


Abb. 20: Ausschnitt einer Übersichtsfärbung mit HE (links) (Objektivvergrößerung x 10) eines invasiv duktales Karzinoms der Mamma, schlecht differenziertes Karzinom (G3), Tumorzellen in Nester angeordnet, teilweise strangförmig.

Abb. 21: Immunhistochemische Darstellung von Dystroglykan (rechts) im invasiv duktales Karzinom der Mamma mittels APAAP-Technik, Objektivvergrößerung x20, nahezu vollständiger Verlust des Glykoproteins (Score 0).

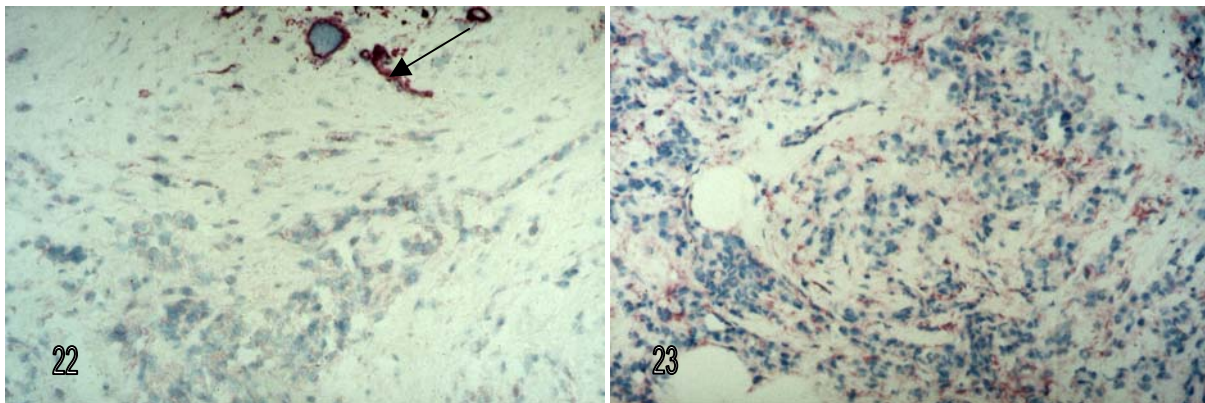


Abb.22: Immunhistochemische Darstellung von Laminin-2 mittels APAAP-Technik (links), Objektivvergrößerung x20, im invasiv duktales Karzinom der Mamma, aufgehobene Anfärbung des Liganden (Score 0). Deutliche Anfärbung des Proteins im Bereich der Basalmembran der Blutgefäße (Pfeil).

Abb.23: Nachweis von myoepithelialen Zellen mit Antikörpern gegen glattmuskuläres Aktin (ASMA) (rechts) mittels APAAP-Technik, Objektivvergrößerung x20, im invasiv duktales Karzinom der Mamma, Anfärbung stromaler Zellen diffus zwischen Tumorzellen (Score 0).

4.2. Quantitative Auswertung der Veränderungen von β -Dystroglykan und Laminin-2 im Gewebe der Mamma

In den folgenden Abschnitten wird die mengenmäßige Verteilung der Glykoproteine beschrieben. Betrachtet wurde das Ausmaß der Verluste von DG und Laminin-2 in den einzelnen Strukturen.

4.2.1. β -Dystroglykan und Laminin-2 in benignen Veränderungen der Mamma

Benigne Veränderungen zeigten eine minimale Abnahme des β -Dystroglykanbesatzes (Abb. 24). Die gutartigen Veränderungen waren den Scores 3 (8 Fälle, 80%) und 2 (2 Fälle, 20%) der im Methodenteil genannten Klassifikation zuzuordnen. Den Scores 1 und 0 konnte kein Präparat zugeordnet werden.

Auch Laminin-2 lag in benignen Veränderungen der Mamma in einer vorwiegend kontinuierlichen Verteilung vor. Jedoch war die Laminin-2 -Ausbildung weniger gleichmäßig. 6 Fälle gehörten dem Score 3 (60%), 1 Fall dem Score 2 (10%) und 3 Fälle dem Score 1 (30%) an. Kein Präparat entsprach Score 0.

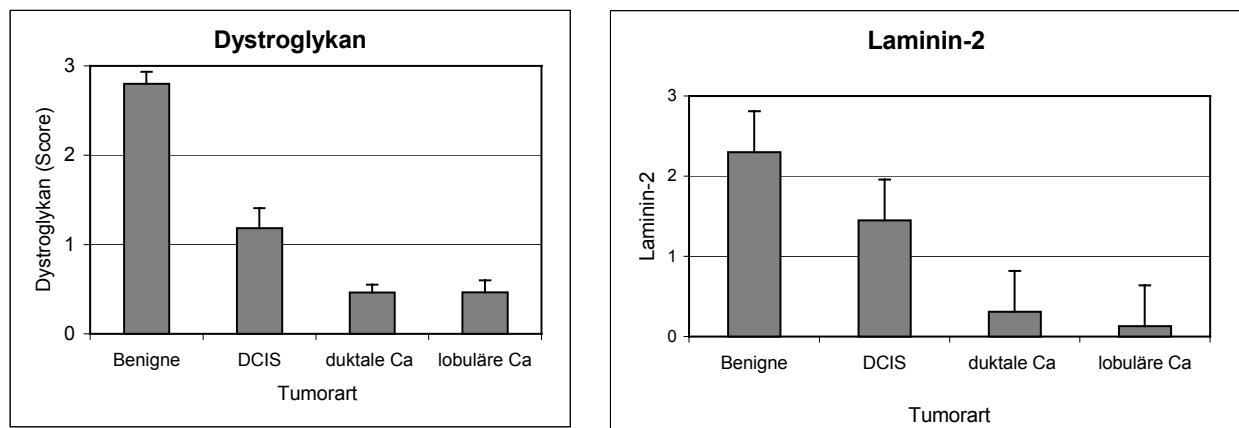


Abb.24: Die Häufigkeit der Scores (gemittelt) von Dystroglykan und Laminin-2 in Abhängigkeit von der Dignität der untersuchten Gewebeprobe. Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.2.2. β -Dystroglykan und Laminin-2 in DCIS

Die Quantifizierung des β -Dystroglykanvorkommens verhielt sich folgendermaßen: 4 Fälle entsprachen dem Score 2 (36%), 5 Fälle von 11 dem Score 1 (45%) und 2 Fälle von 11 dem Score 0 (18%). Eine eindeutige Abnahme der Dichte von β -Dystroglykan konnte somit in den malignen Veränderungen festgestellt werden. Kein Präparat entsprach Score 3.

Laminin-2 war in folgenden Mengen nachweisbar: 1 Fall von 11 entsprach Score 3 (9%). 3 Fälle von 11 wurden Score 2 (27%) zugeordnet. 6 Fälle von 11 wurden als Score 1 (54%) identifiziert. Ein Fall von 11 ließ sich Score 0 (9%) zuordnen. Die Tendenz der Abnahme des Glykoproteingehaltes proportional zum Malignitätsgrad war eindeutig zu erkennen.

4.2.3. β -Dystroglykan und Laminin-2 in invasiv duktalem Karzinom

Die Bestimmung der Verteilung von β -Dystroglykan in invasiv duktalem Karzinom ergab folgendes Bild: 4 Fälle von 54 gehörten zu Score 2 (7%), 17 Fälle von 54 zu Score 1 (31%), 33 Fälle von 54 zu Score 0 (61%). Keines der Präparate der invasiv duktalem Karzinome wies einen vollständigen Besatz mit Dystroglykan auf (= Score 3).

Laminin-2 war wie folgt verteilt: 4 Fälle von 54 entsprechen Score 2 (7%), 9 Fälle von 54 gehörten zu Score 1 (17%) und 41 Fälle von 54 zu Score 0 (76%). Auch hier ließ sich wiederum kein Präparat dem Score 3 zuordnen, so dass eindeutig ein Verlust von Laminin 2 in invasiv duktalem Karzinom belegt ist.

4.2.4. β -Dystroglykan und Laminin-2 in invasiv lobulärem Karzinom

β -Dystroglykan trat in den Präparaten der invasiv lobulären Karzinome in folgenden Mengen auf: 7 Präparate von 15 gehörten zu Score 1 (46%), 8 von 15 zu Score 0 (53%). Auch bei dieser Tumorart ließ sich keines der Präparate den Scores 2 und 3 zuordnen.

Anders verhielt sich die Verteilung von Laminin-2. Zwei Fälle von 15 entsprachen Score 1 (13%) und 13 Fälle von 15 Score 0 (86%). Auch für Laminin 2 bestätigte sich der Verlust bei Vorliegen eines invasiv lobulären Karzinoms, da wiederum kein Gewebeschnitt durch die Scores 2 und 3 beschrieben werden konnte.

4.3. Korrelation des β -Dystroglykan- und Lamininverlustes mit dem Grading und der nodalen Metastasierung der Tumoren

Im folgenden Abschnitt werden die Glykoproteinverteilung mit dem Kerngrad und mit der nodalen Metastasierung korreliert, um den Einfluss des Malignitätsgrades auf die Expression von Dystroglykan und Laminin-2 näher zu charakterisieren. Damit sollte herausgefunden werden, inwieweit sich die beiden Glykoproteine als Marker für den Schweregrad eines Tumors der Mamma eignen.

4.3.1. Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading

Mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher (siehe Methodenteil) wurde die Signifikanz einer möglichen Abhängigkeit des Gradings der Carcinoma in situ, der invasiv duktafen und invasiv lobulären Karzinome von der Menge des vorhandenen β -Dystroglykan bzw. Laminin-2 untersucht.

4.3.1.1. Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading der Carcinoma in situ

Ein Zusammenhang zwischen dem Grading und dem Verlust von β -Dystroglykan ($p = 0,152$) und Laminin-2 ($p = 0,409$) konnte bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht belegt werden (Abb. 25).

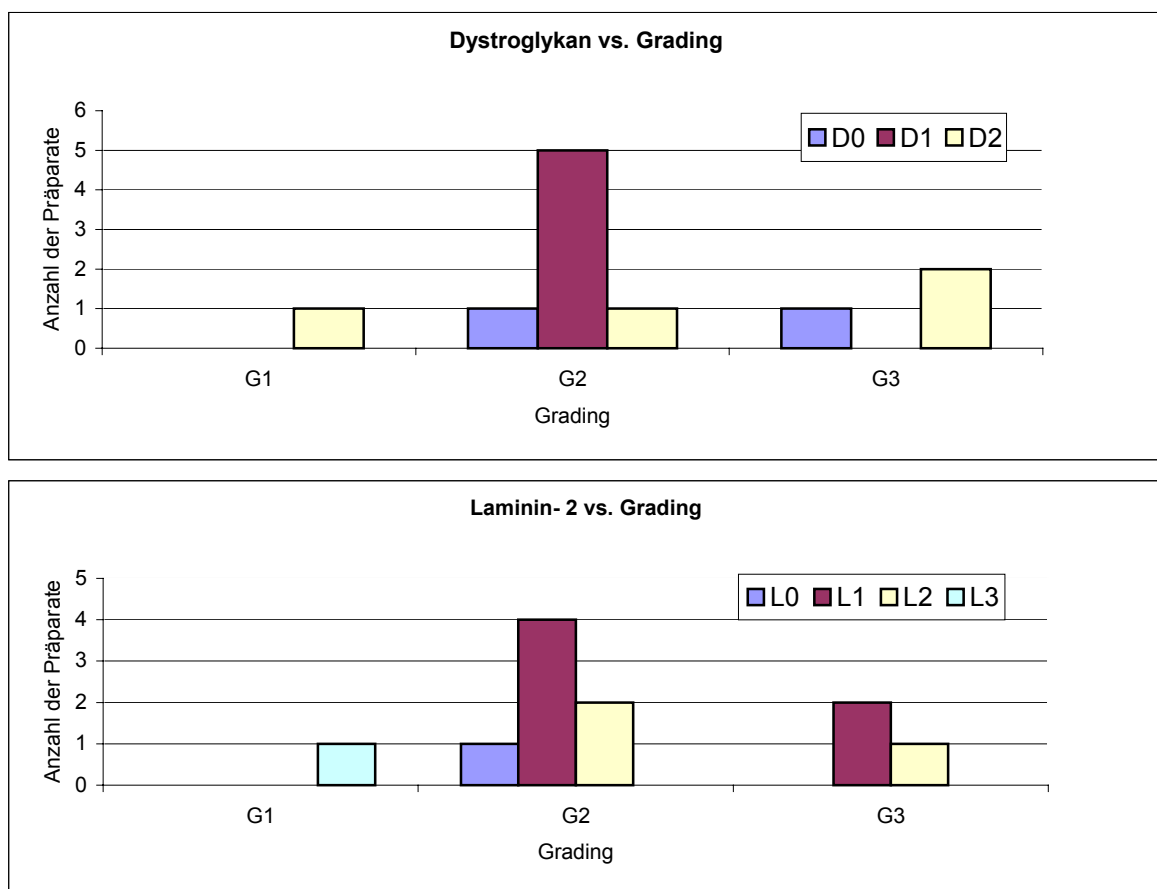


Abb. 25: Häufigkeit der Verluste von Dystroglykan bzw. Laminin-2 in Abhängigkeit vom Grading der Carcinoma in situ.

4.3.1.2. Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading der invasiv dukalen Karzinome

Eine Abhängigkeit zwischen dem Grading und dem Verlust von β -Dystroglykan ($p = 0,197$) und Laminin-2 ($p = 0,170$) konnte für invasiv dukale Karzinome bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht hergestellt werden (Abb. 26).

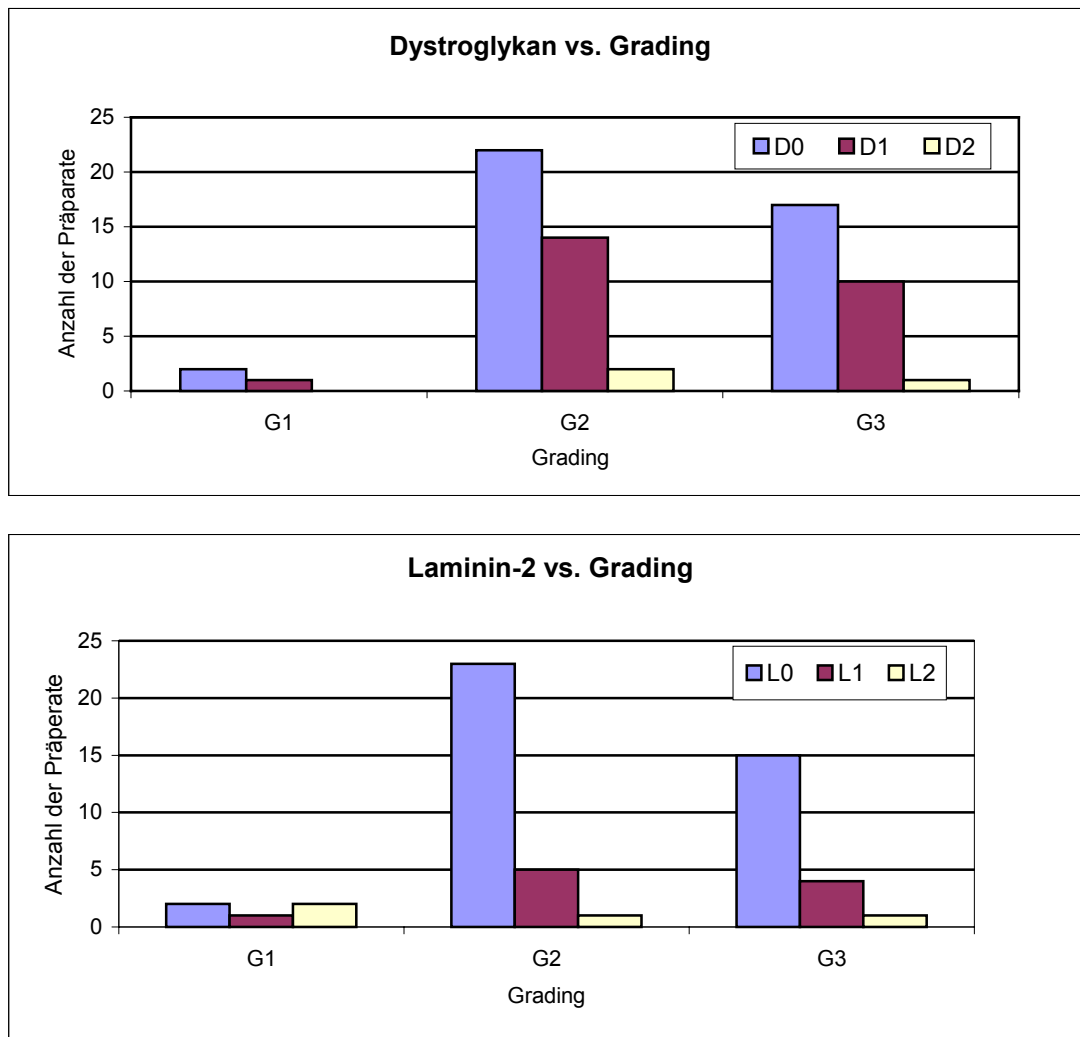


Abb.26: Häufigkeit der Verluste von Dystroglykan bzw. Laminin- 2 in Abhängigkeit vom Grading invasiv duktaler Karzinome.

4.3.1.3. Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit dem Grading der invasiv lobulären Karzinome

Zwischen dem Grading und dem Verlust von β -Dystroglykan ($p = 0,282$) bzw. von Laminin-2 ($p = 0,571$) konnte bei invasiv lobulären bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ keine Korrelation nachgewiesen werden (Abb. 27).

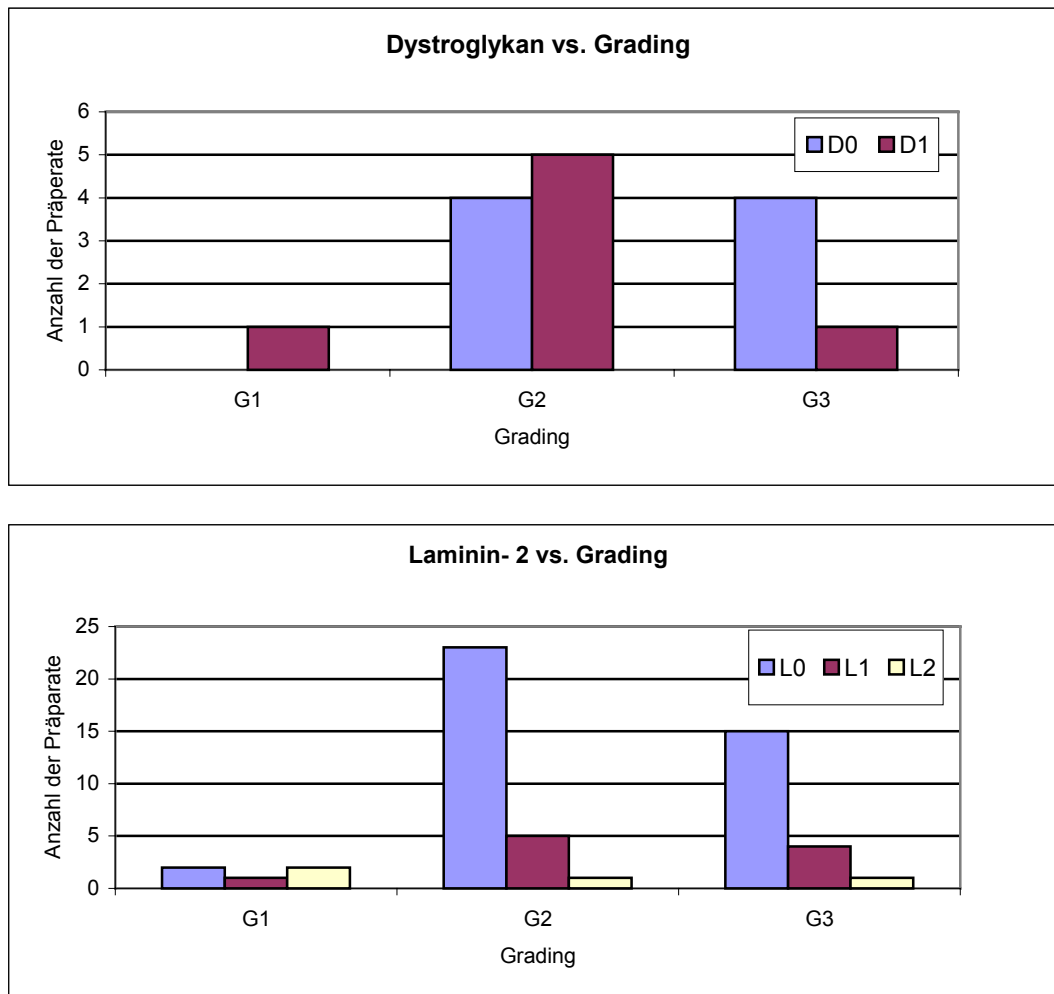


Abb.27: Häufigkeit der Verluste von Dystroglykan bzw. Laminin-2 In Abhängigkeit vom Grading invasiv lobulärer Karzinome.

4.3.2. Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit der nodalen Metastasierung der Tumoren

Mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher wurde die Signifikanz einer möglichen Abhängigkeit der nodalen Metastasierung der invasiv duktafen und invasiv lobulären Karzinome von den nachgewiesenen Mengen an β -Dystroglykan und Laminin-2 untersucht (Abb. 28). 13 (24%) der insgesamt 54 invasiv duktafen Karzinome wiesen eine nodale Metastasierung auf. 19 (35%) von 54 hatten keine Lymphknotenmetastasen. In 22 (41%) von 54 Fällen der invasiv duktafen Karzinome blieb die nodale Metastasierung unbekannt. Die invasiv lobulären Karzinome (n=15) wiesen in 4 Fällen (27%) von 15 Lymphknotenmetastasen auf. 6 Fälle (40%) von 15 waren frei von lymphatischen Metastasen und 5 Fälle (33%) von 15 blieben bezüglich der nodalen Metastasen unbekannt.

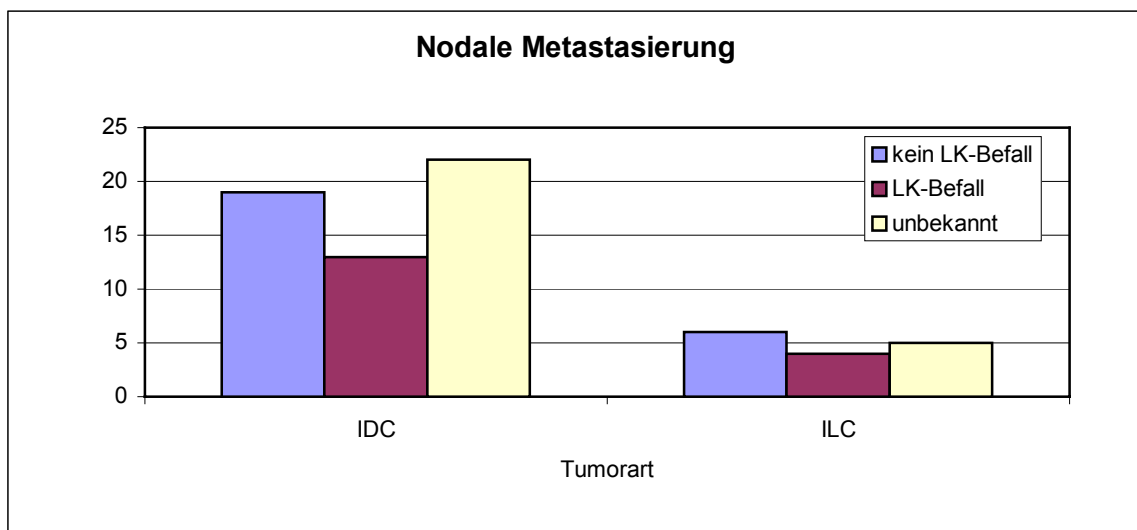


Abb. 28: Vorkommen der nodalen Metastasierung der invasiv duktafen (IDC) und invasiv lobulären Karzinome (ILC).

4.3.2.1. Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit der nodalen Metastasierung der invasiv duktaalen Karzinome

Eine Korrelation zwischen der nodalen Metastasierung der invasiv duktaalen Karzinome und dem Verlust von β -Dystroglykan ($p = 0,954$) und Laminin-2 ($p = 0,815$) konnte bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht belegt werden (Abb. 29).

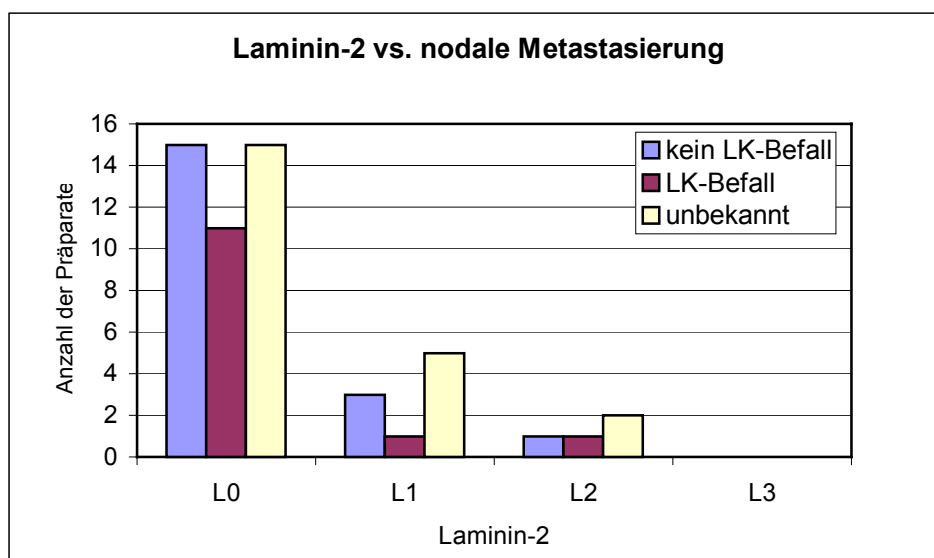
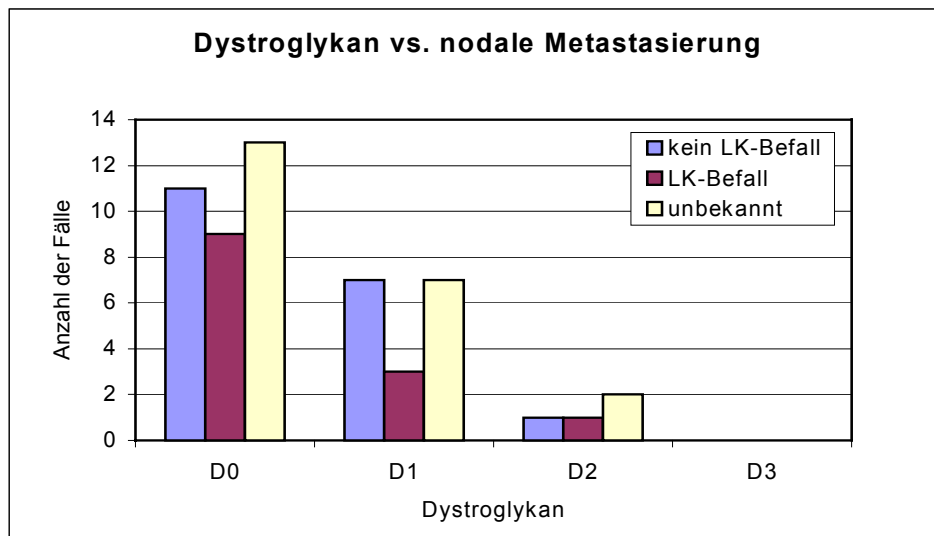


Abb. 29: Häufigkeit der Verluste von Dystroglykan bzw. Laminin-2 in Abhängigkeit von der nodalen Metastasierung der invasiv duktaalen Karzinome.

4.3.2.2. Korrelation des Verlustes von β -Dystroglykan und Laminin-2 mit der nodalen Metastasierung der invasiv lobulären Karzinome

Eine Beziehung zwischen der nodalen Metastasierung der invasiv lobulären Karzinome und dem Verlust von β -Dystroglykan ($p = 1,000$) und Laminin-2 ($p = 1,000$) konnte bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht belegt werden (Abb. 30).

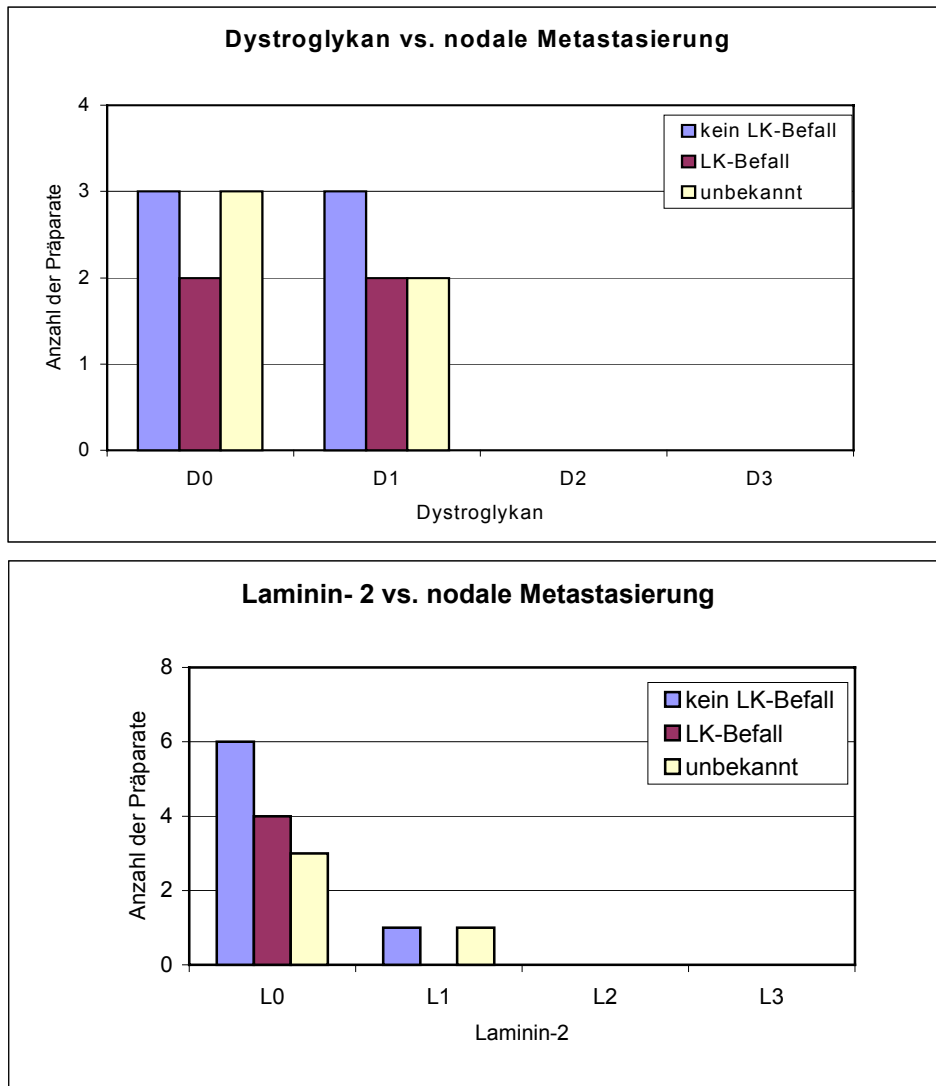


Abb. 30: Häufigkeiten der Verluste von Dystroglykan bzw. Laminin-2 in Abhängigkeit von der nodalen Metastasierung der invasiv lobulären Karzinome.

4.4. Myoepitheliale Zellen

4.4.1. Qualitative Beschreibung des Myoepithels

Myoepitheliale Zellen sind in allen Duktus der Brustdrüse basalmembranwärts zu finden. Jedes Präparat, das gesundes Gewebe aufwies, zeigte eine regelmäßige Darstellung von glattmuskulärem Aktin und Caldesmon auf (vergleiche Abb. 6 und 7). Benigne Veränderungen zeigten ein Verteilungsmuster, das dem der gesunden Brust entspricht (Abb. 11).

Die Mehrzahl der Präparate der Carcinoma in situ zeigte eine kontinuierliche zirkuläre Anfärbung von Myoepithel (Abb. 15) bzw. nur geringgradige Verluste (<10%). Einige Präparate der intraduktalen Karzinome wiesen einen Verlust von myoepithelialen Zellen auf. Es fand sich eine Anfärbung der myoepithelialen Zellen im Stroma (Abb. 32).

Die Duktus einer invasiven karzinomatösen Veränderungen wiesen weniger myoepitheliale Zellen auf bis hin zu einem vollständigen Verlust der zirkulären Anfärbung der myoepithelialen Strukturen (vergleiche Abb. 19 und 23 und 33). Eine diffuse Zunahme von Myoepithelzellen im Stroma war zu verzeichnen.

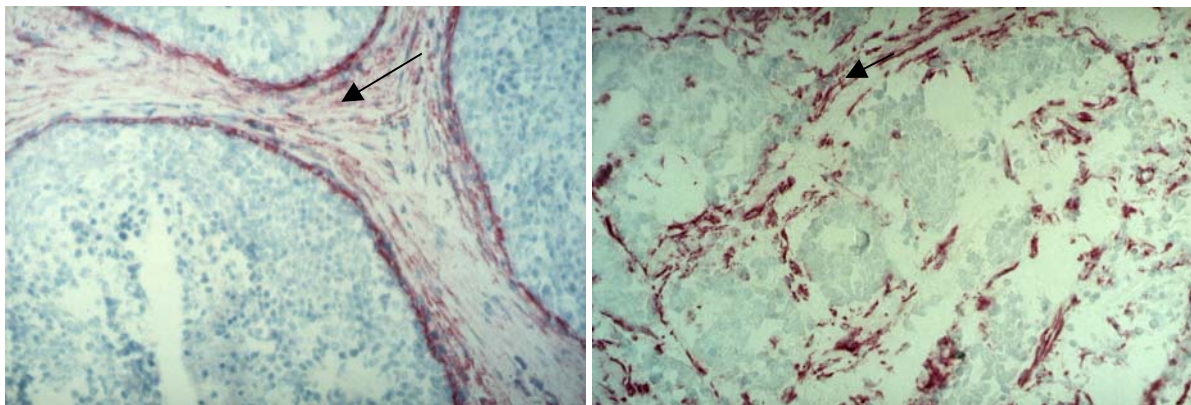


Abb.32 und 33: Immunhistochemische Darstellung von Caldesmon (mittels APAAP-Technik, Objektivvergrößerung x20) im intraduktalen Karzinom (links) und im invasiv duktalem Karzinom (rechts). Links: vollständiges Vorhandensein der myoepithelialen Zellen entlang der duktalem BM (Score 3), Anfärbung von Myoepithel im Stroma (Pfeil). Rechts: BM-assoziiert keine Anfärbung von Myoepithel (Score 0), Nachweis im Stroma (Pfeil).

4.4.2. Quantitative Beschreibung des Myoepithels

Das Auftreten myoepithelialer Strukturen verändert sich in Abhängigkeit von der Dignität des Tumors (Abb. 31).

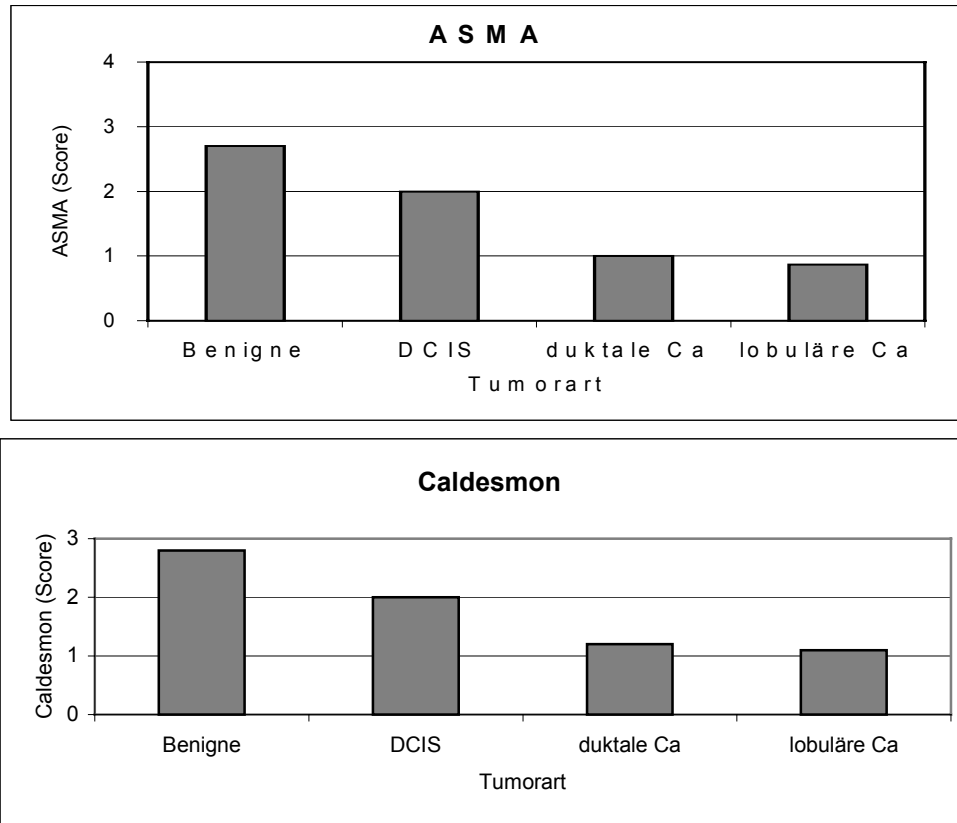


Abb. 31: Häufigkeit der Scores (gemittelt) der myoepithelialen Zellen bezüglich einzelner Tumorarten.

Folgende Verteilung war in den einzelnen Präparaten nachweisbar:

In benignen Veränderungen waren von den Darstellungen des Myoepithels mit ASMA 7 von 10 Fällen dem Score 3 zu zuordnen (70%) und 3 von 10 Fällen dem Score 2 (30%). 8 von 10 Fälle (80%) entsprachen von den Präparaten, in denen Caldesmon dargestellt war, Score 3, 2 von 10 Fällen (20%) entsprachen Score 2.

Für die DCIS galt, dass bezüglich der Färbung von ASMA und Caldesmon jeweils 2 von 11 Fällen (18%) Score 3, 7 von 11 Fällen (64%) Score 2 und 2 von 11 Fällen Score 1 (18%) entsprachen.

In IDC waren 1 Fall von 54 (2%) Score 2, 10 von 54 Fällen (19%), 31 von 54 Fällen (57%) Score 1 und 12 von 54 (22%) Score 0 zu zuordnen (Daten für ASMA-Darstellung). Die Caldesmonfärbung ergab: 18 von 54 (33%) Score 2, 31 von 54 Fällen (57%) Score 1 und 5 von 54 (9%) Score 0.

Für die ILC konnte folgendes gezeigt werden: 4 von 15 Fällen (27%) Score 2, 5 von 15 (33%) Score 1 und 6 von 15 (40%) Score 0 (ASMA-Darstellung). 1 von 15 Fällen (7%) Score 3, 2 von 15 (13%) Score 2, 10 von 15 (67%) Score 1 und 2 von 15 (13%) Score 0 (Caldesmondarstellung).

5. Diskussion

Der Aufbau und die strukturelle und morphologische Einordnung von Laminin-2 und dem Dystroglykan-Rezeptor-Komplex als Ligand und Rezeptor besonders in muskulärem Gewebe wurden in der Einleitung dargestellt. Das Vorkommen in epitheliale, gesundem, adulten Mammagewebe und in typischen Karzinomen der weiblichen Brust werden in der Diskussion näher betrachtet.

5.1. Laminin-2 und sein Rezeptor Dystroglykan sind reguläre Bestandteile des duktales Epithels der Mamma

5.1.1. Laminin-2 als regulärer Bestandteil des Mammaepithels

Der Interaktion zwischen Laminin-2 und seinem Rezeptor Dystroglykan und deren physiologischer Bedeutung im nicht-muskulären Gewebe, speziell dem ausdifferenzierten, adulten Mammagewebe, hat bislang in der Literatur kaum Beachtung gefunden. Gusterson und Mitarbeiter beschrieben bereits 1982 ein reguläres Auftreten von Laminin als Bestandteil der Basalmembran von Duktus und Lobuli des Gewebes der normalen, gesunden, menschlichen Brust. Eine Unterscheidung von verschiedenen Laminin-Isoformen war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Henry und Mitarbeiter (2001) konnten das kontinuierliche Auftreten von Laminin im Bereich der Basalmembran von gesundem, menschlichen Brustgewebe nachweisen. Weiterhin bestätigten Henry und Mitarbeiter das Vorkommen von Laminin im Bereich von Basalmembranen der Blutgefäße. Die Autoren treffen jedoch keine Aussage über die Isoform des nachgewiesenen Laminins, da der verwendete Antikörper spezifisch für verschiedene Lamininisoformen war.

Die Unterteilung in verschiedene Ketten erfolgte am Ende der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts. Hewitt und Mitarbeiter (1997) untersuchten das Vorkommen der $\alpha 2$ -Untereinheit der Laminine im Bereich der Basalmembranen der Duktus und Lobuli im normalen, gesunden, menschlichen Brustgewebe. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen konnte von Hewitt et al. ein Vorkommen von dieser Untereinheit an den Basalmembranen der Drüsenstrukturen nicht gefunden werden.

Die $\alpha 2$ -Kette des Laminins war in dieser Untersuchung in Präparaten von gesundem Mammagewebe lediglich an Basalmembranen der Gefäße darstellbar.

In der vorliegenden Untersuchung konnte die $\alpha 2$ -Kette von Laminin im Gegensatz zu der Arbeit von Hewitt und Mitarbeitern (1997) als physiologischer Bestandteil der Basalmembran sowohl von Drüsenstrukturen als auch von Gefäßen nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang hierbei unter Verwendung des gleichen Antikörpers (Klon 5H2). Als mögliche Ursachen für diese differierenden Ergebnisse könnte die längere Inkubation (über Nacht in der eigenen Untersuchung gegenüber einer Stunde bei Hewitt et al.) und die Anwendung der APAAP-Technik (statt der zweischrittigen indirekten Immunoperoxidase-Methode, die von Hewitt et al. Eingesetzt wurde) gesehen werden.

Berücksichtigt man weitere Literaturangaben, so sprechen die Befunde anderer Autoren für die Richtigkeit der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, denn Durbeej und Mitarbeiter beschrieben 1998 (b) das Vorkommen von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ - Ketten von Laminin im Bereich der Basalmembran des Drüsenepitheliums im gesunden Brustgewebe von Mäusen.

Auch durch den Vergleich mit Untersuchungen an anderen Drüsengeweben kann die Richtigkeit der vorliegenden Befunde bestätigt werden. Strassburger und Mitarbeiter (1998) berichteten über eine vergleichbare Laminindeposition in den Azini der menschlichen Speicheldrüsen. Im Pankreasgewebe der Maus konnte von Durbeej und Mitarbeitern (1998) das reguläre Vorkommen von der $\alpha 2$ -Kette von Laminin im Epithel nachgewiesen werden.

5.1.2. Dystroglykan als regulärer Bestandteil des Mammaepithels

Da Laminin-2 im Gewebe der Brust zu finden ist, konnte erwartet werden, dass sein spezifischer Rezeptor Dystroglykan ebenso dort nachweisbar sein müsste. Das Auftreten von Dystroglykan im Gewebe der weiblichen, adulten, gesunden Brust der Frau wurde in dieser Arbeit systematisch untersucht. Erstmals wurden Serienschritte, die die räumliche Ko-Lokalisation von Ligand (Laminin-2) und Rezeptor (Dystroglykan) deutlich werden lassen, angefertigt.

Dystroglykan wurde als Muskelprotein im menschlichen Skelettmuskel (in den T-Tubuli, wo es am Sarkolemm gebunden vorliegt und eine zentrale Komponente des

Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes darstellt), und im menschlichen Herzmuskel beschrieben (Ibraghimov-Breskrovnaya et al. 1993).

Dystroglykan wurde daher bislang vorrangig als Muskel-spezifisches Protein gesehen. In der Arbeit von Durbeej und Campbell (1999) wurde bereits deutlich, dass Dystroglykan, das nicht im Skelettmuskel anzutreffen ist, in zwei unterschiedlichen Formen vorkommt. In glatter Muskulatur wurde Dystroglykan von den gleichen Autoren als Teil eines Komplexes aus β -, δ - und ε -Sakroglykan, Sakrospan und Dystrophin/Utrophin beschrieben und ähnelt somit dem Dystroglykan des Skelettmuskels. Der zweite von Durbeej und Campbell nachgewiesene Dystroglykan-Komplex findet sich in epithelialem Gewebe (Lunge, Niere) und ist nicht mit Sakroglykan oder Sakrospan assoziiert.

Das Vorhandensein von Dystroglykan als epitheliales Protein an der Zelloberfläche von Podozyten der Niere wurde von Raats und Mitarbeitern (2000) immunhistochemisch nachgewiesen.

Durbeej und Mitarbeiter (1998b) untersuchten das Auftreten von Dystroglykan im gesunden Brustgewebe der Maus. Ihre tierexperimentellen Ergebnisse stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen, die an menschlichem Brustdrüsengewebe erhoben worden sind, überein. Auch im Pankreasgewebe war DG von den Autoren nachweisbar.

Aus den vorliegenden Untersuchungen wird die Bedeutung Dystroglykans als extra-muskulärer Laminin-Rezeptor deutlich. Das physiologische, regelmäßige Vorhandensein von Dystroglykan in duktalem und lobulären Zellen der weiblichen Brust ist in dieser Arbeit eindeutig belegt worden. Dass Dystroglykan regulärer Bestandteil des Epithels der menschlichen Mamma ist, konnte in dieser morphologischen Untersuchung gezeigt werden.

Die Expression von Dystroglykan in normalem menschlichen Brustgewebe wurde auch von Henry und Mitarbeitern (2001) beschrieben. Das Vorkommen von DG in Epithelzellen der Duktus und Lobuli konnte bestätigt werden. Dabei ist ein Unterschied bezüglich der Verteilung zwischen Zellen, die der Basalmembran zugewandt sind, und luminalen Zellen des Brustdrüsenepithels gesehen worden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Außerdem wurde von Henry und Mitarbeitern (1997) über ein Vorkommen von Dystroglykan im fibrösen Stroma berichtet. Das in der eigenen Untersuchung nachgewiesene Auftreten von Dystroglykan in den Zellen der Duktus und Lobuli sowie im Stroma ist

demnach auch mit den genannten Ergebnissen von Henry und Mitarbeitern im Einklang.

Auch Sgambato und Mitarbeiter (2003) wiesen Dystroglykan (jedoch α -Dystroglykan) in gleicher Weise in Zellen normalen Mammaepithels nach. Folgerichtig passen sich die erhobenen Ergebnisse in das Schrifttum ein. Als Positivkontrolle dienten in der eigenen Untersuchung muskuläre Strukturen, die in den betrachteten Präparaten zufällig mit angeschnitten worden sind .

5.2. Die konstante Expression von Laminin-2 und Dystroglykan in benignen histopathologischen Läsionen der Mamma

Hewitt und Mitarbeiter (1997) beschrieben das Vorkommen der $\alpha 2$ -Kette des Laminins, und damit von Laminin-2, im Bereich der epithelialen Basalmembranen des Brustdrüsengewebes bei Vorliegen von Fibroadenomen der Mamma im Gegensatz zum normalen, gesunden Brustgewebe, wo sich von den Autoren kein Laminin-2 nachweisen ließ.

Die eigenen Ergebnisse und die Resultate von Hewitt und Mitarbeitern (1997) zeigen, dass Laminin-2 in benignen Veränderungen der Brust unverändert vorliegt. Die gutartige Tumoren weisen keinen Verlust des Glykoproteins auf.

In der Literatur ist bislang keine Untersuchung des Vorkommens oder der veränderten Expression von Dystroglykan in benigne verändertem Gewebe der Mamma beschrieben worden, so dass eine vergleichende Betrachtung mit den eigenen Daten nicht vorgenommen werden kann.

Die vorliegende Untersuchung belegt, dass Laminin-2 und Dystroglykan regulärer Bestandteile des benigne veränderten Gewebes sind und dass in benignen Veränderungen (Fibrosen, Mastitiden, Papillome, Duktusproliferationen und Narbengewebe) keine veränderte Expression der Glykoproteine zu finden ist.

5.3. Der Verlust von Laminin-2 und seinem Rezeptor Dystroglykan in nicht-invasiven und invasiven Karzinomen der Mamma

Da das Mammakarzinom das häufigste Karzinom der Frau ist und im fortgeschrittenen Stadium eine sehr ungünstige Prognose hat, wurde der Modulation

des Rezeptors Dystroglykan und seinem Liganden Laminin-2 in Karzinomen der weiblichen Brust besonderes Interesse beigemessen.

Die Expression der beiden Glykoproteine verändert sich während der malignen Transformation und die Kenntnis über das Ausmaß der Abnahme ist bedeutsam für das Verständnis der Tumorbilogie.

5.3.1. Die Reduktion von Laminin-2 und Dystroglykan im intraduktalen Karzinom (DCIS)

Bereits 1986 wurde von Charpin und Mitarbeitern sowohl immunhistochemisch (Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode) als auch elektronenmikroskopisch das Vorkommen von Laminin im Mammakarzinom untersucht. Laminin (ohne auf die Spezifität einzugehen, Isoformen waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt) wurde im DCIS als kontinuierliche Umrandung an epithelialen und vaskulären BM nachgewiesen. Gorczyca und Mitarbeiter wiesen 1993 eine kontinuierliche, dünne Umrandung der Duktus durch die Anfärbung von Laminin im intraduktalen Karzinom nach. Unterbrechungen der Basalmembranfärbung wurden, im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, nicht gefunden. Auch Damiani und Mitarbeiter (1999) beschrieben eine kontinuierliche Lamininfärbung um die Duktus nachweisen (unter Verwendung Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode, nicht-Isoformenspezifischer Antikörper wurde verwendet). Hewitt und Mitarbeiter (1997) beschrieben ebenfalls eine ununterbrochene Anfärbung der $\alpha 2$ -Kette von Laminin in DCIS (mit zweischrittiger Immunoperoxidase-Methode). Das Bestehen der regelrechten Basalmembranstrukturen ist wahrscheinlicher, da im Carcinoma in situ die BM noch nicht durchbrochen ist.

Als Gründe für die unterschiedlichen Resultate sind die niedrige Fallzahl und die betrachteten Dysplasiegrade zu diskutieren.

Das Vorkommen von Dystroglykan im intraduktalen Karzinom wurde bislang von keinen anderen Autoren beschrieben, so dass der in dieser Arbeit beschriebene Verlust nicht vergleichend diskutiert werden kann.

5.3.2. Die verminderte Expression von Laminin-2 im invasiven Karzinom der Mamma

Die im Mammakarzinom auftretenden Veränderungen der Basalmembran, und damit von Laminin-2, sind malignitätsrelevante Eigenschaften. Hewitt und Mitarbeiter (1997) beobachteten den Verlust von Laminin-2 und die daraus resultierende Unterbrechungen der Anfärbung der Basalmembran in Karzinomen ohne spezielle Klassifizierung und in invasiv lobulären Karzinomen. Diese Angaben sind somit mit den Erkenntnissen der vorliegenden Untersuchung vergleichbar.

Der Verlust von Laminin in Adenokarzinomen der Mamma konnte auch durch Untersuchungen von Henry und Mitarbeitern (2001) ebenso nachgewiesen werden. Das verminderte Auftreten von Laminin-5 wurde von Hao und Mitarbeitern (1996) sowohl in Mamma- als auch in Prostatakarzinomen gefunden. Das Fehlen von Laminin-5 in Karzinomen, die vom Epithel der Zunge ausgehen, haben Ono und Mitarbeitern (1999) beschrieben.

Die maligne Transformation ist in jedem Fall durch den Verlust von Lamininisoformen gekennzeichnet. Die verminderte Expression von Laminin bewirkt eine Reduktion der Basalmembranstabilität, wodurch die Invasion von Tumorzellen in das umgebende Gewebe möglich wird.

5.3.3. Die reduzierte Expression von Dystroglykan im invasiven Karzinom der Mamma

Nach den eigenen Ergebnissen ist die veränderte Expression von Dystroglykan als obligates Phänomen der malignen Transformation zu sehen.

Henry und Mitarbeiter (2001) beschreiben eine Abnahme des Vorkommens von Dystroglykan in immunhistochemischen Präparaten von 6 dukталen Adenokarzinomen der Mamma. Auch bestätigen sie das Auftreten von Dystroglykan im Bereich von stromalen Zellen, die sich innerhalb von Tumorzellkonglomeraten befinden. Die gleichen Autoren beschreiben in der selben Arbeit vergleichend den Verlust von Dystroglykan in Karzinomen der Prostata.

Sgambato und Mitarbeiter (2003) untersuchten α -Dystroglykan im Karzinom der weiblichen Brust und konnten die verminderte Expression nachweisen. In den vorliegenden Untersuchungen war lediglich der Nachweis der β -Untereinheit von

Dystroglykan möglich. Veränderungen der α -Untereinheit von Dystroglykan wurden nicht betrachtet. Möglicherweise verändern sich die beiden Komponenten im Rahmen der Tumorentstehung unterschiedlich, so dass dieser Teilaspekt in weiteren Studien überprüft werden sollte.

Als Ursachen für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist einerseits eine reduzierte Synthese von Glykoproteinen zu sehen. Andererseits ist die Möglichkeit des Auftretens von verändertem Dystroglykan zu diskutieren. Das Vorkommen von anormalem Dystroglykan wurde von Losasso und Mitarbeitern (2000) in verschiedenen Zellreihen in vitro untersucht. Dabei wurde in nicht tumorösen, menschlichen, epithelialen Zellen (184B5 Zellen) das 43 kDa schwere DG nachgewiesen, während in karzinomatösen Zellen (T47D, BT549 und MCF7) ein nur 31 kDa schweres DG gefunden werden konnte. Dieses Dystroglykan mit einer verringerte Masse ließ sich von den selben Autoren auch in weiteren Tumorzellreihen (Kolon-, Prostata- und zervikale Karzinome) nachweisen.

Auch Muschler und Mitarbeiter (2002) untersuchten Dystroglykan in Karzinomzellen. Die Autoren konnten einen Verlust von α -DG in Karzinomzelllinien nachweisen.

5.3.4. Mögliche Ursachen der verminderten Expression

Karzinome wachsen unkontrolliert, unabhängig vom Ausmaß der verminderten Expression von Dystroglykan. Diese Aussage ist nicht verwunderlich, da es in Karzinomen oft zu Rezeptorverlusten kommt, ohne dass Tumorzellen zugrunde gehen. Diese Tatsache reflektiert das autonome Wachstum des Tumors. Maligne transformierte Zellen können sich ungehindert vermehren, speziell wenn verschiedene Rezeptoren, die das normale Wachstum regulieren, nicht mehr oder in veränderter Form exprimiert werden.

Andererseits erscheint es aus entwicklungsbiologischer Sicht notwendig, die Möglichkeit der verminderten Differenzierung zu diskutieren. Das Wachstum des Karzinoms kann als reifungsabhängiger Prozess betrachtet werden, so dass sich sagen lässt, dass während des malignen Wachstums nur wenig differenzierte Reifungsstadien erreicht werden.

Es wurde von Durbeej und Mitarbeitern (1995) beschrieben, dass Antikörper, die die Verbindung zwischen Laminin und Dystroglykan unterbrechen, die Vermehrung von Zellen des Nierengewebes in vitro verhindern, da wichtige Zell-zu-Zell-Signale, die

die Differenzierung steuern, dann nicht in regulärer Weise weitergeleitet werden können. Diese Tatsache macht die immense Bedeutung der regelrechten Funktion von Laminin-2 und Dystroglykan deutlich.

Es ist anzunehmen, dass ein verminderter Dystroglykangehalt zu einer Desorganisation der extrazellulären Matrix führen kann, da im nicht pathologisch veränderten Gewebe Dystroglykan der Stabilisation und der Organisation von Zellen und extrazellulärem Netzwerk dient.

Eine Verminderung des Gehalts von Dystroglykan beeinflusst die Verbindung von Basalmembran und dem Zytoskelett (Ervasti und Campbell, 1993). Defekte in den Strukturen der Basalmembranen und der extrazellulären Matrix sind Merkmale eines veränderten zellulären Phänotyps und mit der Tumorentstehung eng verbunden. Diese seit langem bekannten Tatsachen sind auch auf die veränderten Verteilungsmuster von Dystroglykan anwendbar. Die Veränderungen der extrazellulären Matrix bei malignen Tumoren sind auf ein Missverhältnis von Matrix-degenerierenden Enzymen und deren Inhibitoren zurückzuführen (Woodhouse et al., 1997). Maligne Zelllinien exprimieren übermäßig viele Proteasen (Garbett et al., 2000), besonders membranassoziierte Metalloproteinasen (Vassalli und Pepper, 1994; Sato et al., 1994; Giannelli et al., 1997), die für die Degradation der BM und der extrazellulären Matrix und damit für die ersten Schritte der Tumordinvasion verantwortlich sind. Es ist somit möglich, dass diese Enzyme für den veränderten Dystroglykannachweis mitverantwortlich sind. Jede maligne Entartung geht mit unterschiedlichen Proteinverlusten einher. Der selektive Proteinverlust kann aufgrund der eigenen Untersuchung nicht erklärt werden.

5.4. Veränderungen von Laminin-2 und Dystroglykan korrelieren mit der malignen Transformation und nicht mit der Tumorprogression

Bei malignem Wachstum von Gewebe der weiblichen Brust sind stets Verluste von Laminin-2 und Dystroglykan nachweisbar und zwar unabhängig vom Tumorstadium. Das Ausmaß der Malignität geht unspezifisch sowohl mit Dystroglykanverlusten als auch mit Laminin-2-Verlusten einher. Es besteht nach den eigenen Beobachtungen eine 100%ige Korrelation zur malignen Transformation, denn im Karzinom der Mamma finden sich völlig veränderte Verhältnisse der Ausprägung von Laminin-2

und Dystroglykan. Malignes Wachstum ist durch den Verlust von Laminin-2 und Dystroglykan gekennzeichnet.

Beide Glykoproteine könnten als Marker für ein frühes Stadium der Karzinomentstehung angesehen werden, da bereits im duktalem Carcinoma in situ (DCIS) Verluste von Dystroglykan und Laminin-2 auftreten. Auch ohne invasives Wachstum zeigen die Karzinome der Mamma keine regelrechte Expression von Laminin-2 und Dystroglykan, obwohl die Basalmembran nicht durchbrochen worden ist. Die Ursachen der beschriebenen Veränderungen sollten weiter untersucht werden im Hinblick auf die Fragestellung, inwieweit beispielsweise genetische Mechanismen eine Rolle spielen und wie sich die veränderte Regulation auf die Karzinomentstehung konkret auswirkt. Eine vergleichende Betrachtung mit dem Verlust anderer Rezeptoren und Markermoleküle sollte auf eine mögliche Korrelation überprüft werden.

Beide Glykoproteine können jedoch nicht als Marker für ein spätes Stadium des invasiven Wachstums betrachtet werden, da keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorhandenseins der Proteine und dem Grading oder der nodalen Metastasierung im invasiven Karzinom zu finden waren. Ein Trend, der auf eine mögliche Korrelation von dem Verlust von DG und Laminin-2 dem Grading bzw. nodaler Metastasierung hinweist, war deutlich (Abb. 25; 26; 27; 29 und 30). Rechnerisch ließ sich dieser Trend mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher nicht belegen. In weiteren Untersuchungen wäre möglicherweise eine signifikante Veränderungen nachweisbar (höhere Fallzahl, Verwendung anderer Antikörper).

5.5. Histopathologische und diagnostische Bedeutung des Verhaltens von Laminin-2 und Dystroglykan im Mammakarzinom

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen neuen Kenntnisse über einen koordinierten, malignitätsassoziierten Verlust von Laminin-2 und Dystroglykan können weiterführende Ansätze für die Zellbiologie und Onkologie darstellen.

Das veränderte Vorkommen von Glykoproteinen ist Zeichen einer reduzierten Synthese spezieller Proteine, die für die Aufrechterhaltung normaler Wachstumsprozesse in der Zelle und im Zellverband verantwortlich sind. Im tumorösen Gewebe sind eben diese hochentwickelten Regulationsmechanismen nicht mehr möglich und für das Tumorstadium nicht notwendig. Wenn die

regelrechte Beziehung zwischen Basalmembran und Zelle nicht mehr vorhanden ist, kann die Zelle maligne entarten.

Der komplette histologische Nachweis beider Glykoproteine schließt das Vorhandensein eines Mammakarzinoms aus. Somit könnten Laminin-2 und Dystroglykan große diagnostische Relevanz besitzen. Jedoch kann bereits gegenwärtig geschlussfolgert werden, dass die Überprüfung der Ausprägung der Glykoproteine als Screening für die Routinediagnostik und für die histopathologische Diagnose bedeutungslos sein wird. Denn der Nachweis von Laminin-2 und Dystroglykan ist bislang nur im Gefriermaterial möglich, wogegen die Diagnose eines Mammakarzinoms im formalinfixierten, paraffingebetteten Material gestellt wird. Daher bedarf es weiterer Untersuchungen mittels paraffingängiger Antikörper, um Dystroglykan und Laminin-2 auch mit praxisrelevanten Methoden darzustellen zu können.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit über das veränderte Verhalten der Glykoproteine im Mammakarzinom könnten auch für andere Karzinome relevant sein.

5.6. Die Beziehung zwischen Dystroglykan, Laminin-2 und myoepithelialer Differenzierung in der Mamma

Myoepitheliale Zellen stellen eine Zwischenform von Epithel und Muskelzellen dar. Somit ist auch von einer Beziehung zwischen Myoepithel und muskulärem Rezeptor (Dystroglykan) bzw. muskulärem Basalmembranprotein (Laminin-2) auszugehen. Dass das Myoepithelium regulärer Bestandteil der normalen Mamma ist, konnte in der eigenen Untersuchung bestätigt werden.

Im muskulären Gewebe stellen Laminin-2 und besonders Dystroglykan entscheidende Faktoren für die Integrität dar. Eine Assoziation zwischen der $\alpha 2$ -Kette des Laminins und myoepithelialen Zellen wurde von Strassburger und Mitarbeitern 1998 im Falle der Azini der Speicheldrüsen, also im epithelialen Gewebe bereits beschrieben.

5.6.1. Eignung des Myoepithels zur Differenzierung zwischen benignem und malignem Wachstum

In benignen Läsionen konnte das Myoepithel regulär wie in der gesunden Brust nachgewiesen werden (Gould et al., 1980; Wang et al., 1997; Damiani et al., 1999). Im DCIS zeigen sich bereits keine kontinuierlichen Lagen des Myoepithels innerhalb der Duktus und Lobuli, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gould und Mitarbeitern (1980) steht. Im duktales Carcinoma in situ (DCIS) wurden von anderen Autoren auch geringgradige Verluste (<10%) nachgewiesen (Guelstein et al., 1993). Wang und Mitarbeiter (1997) beschrieben dagegen auch ein kontinuierliches, basalmembranassoziiertes Vorkommen von myoepithelialen Zellen. Zur Differenzierung von duktales Carcinoma in situ und mikroinvasiven Mammakarzinomen sind die myoepithelialen Zellen von großer Bedeutung (Damiani et al., 1998). Immunhistochemisch nachweisbare Myoepithelverluste finden sich an Stellen an denen karzinomatöse Zellen die Invasion beginnen.

Das invasive Mammakarzinom zeigt einen Verlust der myoepithelialen Zellen, die sich zwischen Epithelzellen und entlang der BM befinden, und ein irreguläres Wachstum der myoepithelialen Zellen im Stroma. Diese Aussagen decken sich mit den Angaben von Azzopardi (1979) und Gould und Mitarbeitern (1980). Eine gestörte Zell-Matrix-Beziehung könnte als mögliche Ursache für den Myoepithelzellverlust in Frage kommen. Die im Gesunden vorliegende Ko-Inzidenz im Vorkommen von Dystroglykan, Laminin-2 und Myoepithel geht verloren.

Im umgebenden Stroma des Mammakarzinoms finden sich vermehrt ASMA-positive Zellen. Mögliche Ursache für die stromale Zunahme könnte die Tatsache sein, dass im Karzinom die Zellen im Stroma in der Lage sind, Stimulationsfaktoren für die Replikation der stromalen Fibroblasten zu bilden (Gleiber and Schiffmann, 1984).

Die maligne Tumorzelltransformation geht mit einer Veränderung der Differenzierung zellulärer Strukturen einher. Die Veränderungen in der Myoepithelzelldifferenzierung stellen einen Marker für Malignität dar. Das bedeutet, dass jeder Verlust des Myoepithels das maligne Wachstum charakterisiert.

5.6.2. Der Verlust von Laminin-2, Dystroglykan und myoepithelialen Zellen im Vergleich

Es kann eine Parallelität zwischen dem Auftreten von Dystroglykan, Laminin-2 und Myoepithelzellen im muskulären Gewebe und im gesunden und maligne entarteten Gewebe der Mamma als ein Phänomen betrachtet werden, dem gleiche Ursachen zu Grunde liegen.

In intraduktalen Carcinomen (DCIS) ist der parallele Verlust von Dystroglykan und Laminin-2 bereits nachweisbar, während die Expression von myoepithelialen Strukturen noch länger erhalten bleibt.

Laminin-2 und Dystroglykan sowie myoepitheliale Zellen sind im Mammakarzinom in ähnlichem Ausmaß verändert. In vergleichbaren Präparaten sind gleichermaßen ausgeprägte Verluste immunhistochemisch nachweisbar.

Die neuen Erkenntnisse über die Verluste von Laminin-2 und Dystroglykan im Mammakarzinom sind die zellbiologische Fortsetzung von der Aussage, dass das Mammakarzinom am Myoepithelzellverlust erkennbar ist. Es existieren aufgrund dieser Untersuchung zwei weitere Marker (Dystroglykan und Laminin-2), die zur Diagnostik des Karzinoms der Mamma herangezogen werden können. Offen bleibt, ob der Myoepithelzellverlust wegen Veränderung des Rezeptors Dystroglykan und seinem Liganden Laminin-2 zustande kommt, oder ob die Rezeptorveränderung wegen Myoepithelzellverlust eintritt. Deshalb ist es notwendig verschiedene unterschiedliche Stadien der DCIS zu betrachten, denn nur unter Einbeziehung der unterschiedlichen Phasen der malignen Transformation lässt sich eine quantitative Beurteilung von DG, Laminin-2 und Myoepithel vornehmen. Nur dann man differenzieren, welche Komponente während der malignen Transformation zuerst vermindert bzw. verändert exprimiert wird.

6. Schlussfolgerungen

1. Die vorliegende Arbeit erlaubt eine verbesserte Charakterisierung histologischer Präparate der Mamma: In Gewebeschnitten der normalen, gesunden Mamma konnten Dystroglykan und sein Ligand Laminin-2 sowie myoepitheliale Zellen als physiologische, für die Integrität des Gewebes erforderliche Bestandteile ausnahmslos nachgewiesen werden. Es gibt kein gesundes Mammaepithel ohne komplett vorhandenes Dystroglykan und Laminin-2.
2. Benigne histopathologische Läsionen zeigen keine Veränderung bezüglich des Vorkommens von Dystroglykan und Laminin-2. Die Zell-Matrix-Interaktion, vermittelt durch Laminin-2 und Dystroglykan, ist in benignen Veränderungen intakt.
3. In nicht-invasiven karzinomatösen Läsionen sind Dystroglykan, Laminin-2 und das Myoepithel in der eigenen Untersuchung vermindert nachweisbar und charakterisieren die maligne Differenzierungsstörung.
4. Jede invasive, karzinomatöse Progression ist mit einem Verlust von Dystroglykan, Laminin-2 und myoepithelialen Zellen verbunden. Sukzessive, parallel zum Fortschreiten des Karzinoms gehen der Rezeptor Dystroglykan, sein Ligand, Laminin-2 und die myoepitheliale Differenzierung verloren. Welches Protein dabei zuerst in verminderter Form vorliegt, ist auf der Basis der rein morphologischen Analyse heraus nicht beurteilbar.
5. Eine signifikante Korrelation zwischen dem graduellen Verlust der beiden Glykoproteine Dystroglykan und Laminin-2 und dem Grading oder der nodalen Metastasierung konnte nicht gefunden werden.
6. Der Verlust der Glykoproteine und die damit veränderte Zell-Matrix-Beziehung korrelieren mit der Tumortransformation (entsprechend der frühen Phase der Tumorentwicklung), nicht aber mit der Tumorprogression (entsprechend der späten Phase der Tumorentwicklung). Die Tumorprogression wird durch die Veränderungen der Expression von Dystroglykan und Laminin-2 nicht adäquat reflektiert. Beide Glykoproteine können somit nicht als Prognosefaktor genutzt werden, auch wenn sich ein Trend einer veränderten Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium andeutet.
7. Da der koinzidente Verlust myoepithelialer Zellen in der Arbeit nachgewiesen werden konnte, ist das Verhalten von Dystroglykan und Laminin-2 relevant für alle

Gewebe, die Myoepithel besitzen. Veränderungen im Gewebe der menschlichen Speicheldrüsen, dem Pankreas, und der Schweißdrüsen sowie deren maligne Entartung sollten bezüglich des Vorkommens von DG und Laminin-2 untersucht werden. Es erscheint sinnvoll, die Relevanz der Veränderungen von DG und Laminin-2 für andere Karzinome vergleichend zu betrachten. Die immunhistochemische Bewertung der DG-Ln-2-Interaktion trägt die Potenz in sich, frühe karzinomassoziierte Differenzierungsstörungen bzw. gestörte Zell-Matrix-Interaktionen aufzuzeigen.

8. Intakte Dystroglykan- und Laminin-2-Beziehungen können Karzinome ausschließen. Das Fehlen der beiden Glykoproteine lässt die Annahme zu, dass ein Karzinom der Mamma vorliegt. Eine Unterscheidung zwischen invasivem und nicht-invasivem, sowie metastasiertem und nicht-metastasiertem Karzinom kann durch die Bestimmung der veränderten Expression von Dystroglykan und Laminin-2 nicht getroffen werden.

7. Anhang

Diagnose	TNM	Grading	Dystroglykan	Laminin-2	ASMA	Caldesmon
Ductusproliferation			2	2	2	3
Ductusproliferation			3	3	3	3
Fibroadenom			3	1	3	2
Fibroadenom			3	3	3	3
Fibroadenom			3	3	3	3
Fibroadenom			2	1	2	3
Fibrose			3	3	3	3
Mastitis			3	3	3	3
Narbe			3	1	2	3
Papillom			3	3	3	2
DCIS	pTis N0M0	3	0	2	2	2
	pTisN0M0	3	2	1	2	2
	pTisN0M0	2	2	2	2	2
	pTisN0M0	2	1	2	2	1
	pTisN0M0	2	1	1	1	2
	pTisN0M0	3	2	1	3	2
	pTisN0M0	1	2	3	3	1
	pTisN0M0	2	1	1	2	3
	pTisNxMx	2	1	1	1	3
	unbekannt	2	0	1	2	2
	unbekannt	2	1	1	2	2
invasiv duktale Karzinome	pT1aNbiiiM0	3	0	0	2	1
	pT1bN0M0	1	1	0	3	1
	pT1bN0M0	3	0	0	0	1
	pT1bN0M0	3	0	0	1	0
	pT1bN0M0	2	0	0	1	1
	pT1bN0Mx	2	1	0	1	1
	pT1bNbiiiM0	2	0	0	1	1
	pT1bNxMx	3	1	1	1	2
	pT1cN0M0	1	0	2	1	1
	pT1cN0M0	2	0	0	1	2
	pT1cN0M0	3	0	0	1	1
	pT1cN0M0	2	1	1	1	1
	pT1cN0M0	3	1	0	2	0
	pT1cN0M0	2	0	0	1	2
	pT1cN0Mx	2	0	0	0	1
	pT1cN0Mx	2	0	0	2	0
	pT1cN0Mx	2	0	0	1	2
	pT1cN0Mx	2	0	0	0	1
	pT1cN0mx	2	0	0	1	2
	pT1cN0Mx	2	0	0	0	2
	pT1cN0Mx	2	0	1	0	2
	pT1cN0Mx	1	1	0	1	1
	pT1cN0Mx	1	2	2	2	1
	pT1cN0Mx	3	0	0	0	1
	pT1cN0Mx	3	0	1	1	1
	pT1cN0Mx	3	1	0	1	1
	pT1cN0Mx	2	1	0	1	0
	pT1cNbIMx	2	0	0	2	2

	pT2N0M0	3	2	1	1	2
	pT2N0M0	2	0	1	1	2
	pT2N0M0	3	0	0	0	2
	pT2N0M0	2	1	0	1	2
	pT2N0M0	2	0	0	1	0
	pT2N0Mx	1	1	0	1	1
	pT2N0Mx	2	0	0	1	1
	pT2N0Mx	3	0	0	1	1
	pT2N0Mx	2	0	1	2	1
	pT2N0Mx	2	1	1	1	1
	pT2N1biiiM0	3	0	0	2	1
	pT2N1biiiM1	3	0	0	0	1
	pT2N1biiM0	3	1	1	1	2
	pT2N1biM0	2	0	0	1	2
	pT2N1biM0	2	2	0	0	1
	pT2N1biM0	2	1	0	1	1
	pT2N1biM0	3	1	0	0	1
	pT2Nb1biiiM0	3	0	0	1	1
	pT2NbiiM0	2	0	2	2	1
	pT4bN1M1	2	0	0	1	2
	pT4N0Mx	2	1	0	1	2
	unbekannt	3	0	0	2	2
	unbekannt	3	2	2	1	1
	unbekannt	2	0	0	2	1
	unbekannt	3	1	0	0	2
	unbekannt	2	1	0	0	1
invasiv lobuläre Karzinome	pT1bN1M0	2	0	0	2	1
	pT1cN0M0	2	0	1	2	1
	pT1cN0M0	3	0	0	0	2
	pT1cN0Mx	3	1	0	2	1
	pT1cN0Mx	2	1	0	0	3
	pT1cN0Mx	2	1	0	1	1
	pT1cN2M1	2	1	0	1	0
	pT1cNbiM0	1	1	0	0	1
	pT1cNbiM0	3	0	0	1	1
	pT1cNxMx	2	0	0	0	0
	pT2N0M0	3	0	0	0	1
	pT2N0Mx	2	0	0	1	1
	pT2N0Mx	2	1	1	2	1
	pT2N1bM0	2	1	0	0	2
	pT4bNxMx	3	0	0	1	1

8. LITERATURVERZEICHNIS

ADAM J and WATT F (1993): Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. Dev. 117: 1183-1198.

ALBRECHTSEN R, NIELSEN M, WEWER U, ENGVALL E and RUOSLAHTI E (1981): Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. Cancer Res. 41: 5076-5081.

AUMAILLEY M and SMYTH N (1998): The role of laminins in basement membrane function. J. Anat. 193: 1-21.

AZZOPARDI JG: Problems in breast pathology. In: Benington JL (Hrsg.): Major problems in pathology, Bd. 11, Saunders, Philadelphia (1979), S. 168-233.

BÄSSLER R: Mamma, In: Remmele W (Hrsg.): Pathologie, Bd. 4, Springer, Berlin und Heidelberg (1997), S. 173-218.

BEWICK GS, NICHOLSON LVB, YOUNG C and SLATER CR (1993): Relationship of a dystrophin-associated glycoprotein to junctional acetylcholin receptor clusters in rat skeletal muscle. Neuromusc. Disord. 3: 503-506.

BLOOM HJG and RICHARDSON WW (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1709 cases which 359 have been followed for 15 years. Brit. J. Cancer 2: 353-377.

BOWE MA, DEYST KA and FALLON JR (1994): Identification and purification of an agrin receptor from torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. Neuron 12: 1173-1180.

BOWE MA, MENDIS DB and FALLON JR (2000): The small leucine-rich repeat proteoglycan biglycan binds to α -dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. J. Cell Biol. 148: 801-810.

BRANCACCIO A, SCHULTHESS T, GESEMANN M and ENGEL J (1995): Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle alpha-dystroglycan. FEBS Lett. 368:139-142.

BREDT DS (1999): Knocking signalling out of the dystrophin complex. Nat. Cell Biol. 1: E89-E91.

BURGESON RE, CHIQUET M, DEUTZMANN R, EKBLOM P, ENGEL J, KLEINMANN H, MARTIN GR, MENEGUZZI G, PAULSSON M and SANES J (1994): A new nomenclature for the laminins. Matrix Biol. 14: 209-211.

CAMPANELLI JT, ROBERDS SL, CAMPBELL KP and SCHELLER RH (1994): A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR-clustering. *Cell* 77: 663-674.

CAMPBELL KP (1995): Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679.

CAMPBELL KP and CROSBIE RH (1996): Utrophin to the rescue. *Nature (Lond.)* 384: 308-309.

CAO W, HENRY MD, BORROW P, YAMADA H, ELDER JH, RAVKOV EV, NICHOL ST, COMPANS RW and CAMPBELL KP (1998): Identification of α -dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and lassa fever virus. *Science* 11: 2079-2081.

CARTAUD A, COUTANT S, PETRUCCI TC and CARTAUD J (1998): Consequence for acetylcholine receptor clustering at the synapse. *Biol. Chem.* 273: 11321-11326.

CAVALDESI M, MACCHIA G, BARCA S, DEFILIPPI P, TARONE G and PETRUCCI TC (1999): Association of dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J. Neurochem.* 72: 1648-1655.

CHAMPLIAUD MF, LUNSTRUM GP, ROUSELLE P, NISHIYAMA T, KEENE DR and BURGESSON RE (1996): Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J. Cell. Biol.* 132: 1189-1198.

CHANG AC, WADSWORTH S and COLIGAN JE (1993): Expression of merosin in the thymus and its interaction with thymocytes. *J. Immunol.* 151: 1789-1801.

CHARDIN P, CUSSAC D, MAIGNAN S and DUCRUIX A (1995): The Grb2 adaptor. *FEBS Lett.* 369: 47-51.

CHARPIN C, LISSITZKY JC, JAQUEMIER J, LAVANT MN, KOPP F, POURREAU-SCHNEIDER N, MARTIN PM and TOGA M (1986) : Immunohistochemical detection of laminin in 98 human breast carcinomas: A light and electron microscopic study. *Hum. Pathol.* 17: 355-365.

COLOGNATO H and YURCHENCO PD (2000): Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218: 213-234.

CULLEN MJ, WALSH J and NICHOLSON LVB (1994): Immunogold localization of the 43 kDa dystroglycan at the plasma membrane in control and dystrophic human muscle. *Acta Neuropathol.* 87: 349-354.

D'ARDENNE AJ, RICHMANN PI, HORTON MA, MC AULAY AE and JORDAN S (1991): Co-ordinate expression of the $\alpha 6$ -integrin laminin receptor subunit and laminin in breast cancer. *J. Pathol.* 165: 213-220.

DAMIANI S, LUDVIKOVA M, TOMASIC G, BIANCHI S, GOWN AM and EUSEBI V (1999): Myoepithelial cells and basal lamina in poorly differentiated insitu duct carcinomas of the breast. *Virch. Arch.* 434: 227-234.

DENZER AJ, SCHULTHESS T, FAUSER C, SCHUMACHER B, KAMMERER RA, ENGEL J and RUEGG MA (1998): Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin 1. *EMBO J.* 17: 335-343.

DURBEEJ M and CAMPBELL KP (1999): Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex. *J. Biol. Chem.* 274: 26609-26616.

DURBEEJ M and EKBLOM P (1997): Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. *Exp. Lung. Res.* 23: 109-118.

DURBEEJ M, LARSSON E, IBRAGHIMOV-BRESKROVNAYA O, ROBERDS S, CAMPBELL K and EKBLOM P (1995): Non-muscle α -dystroglycan is involved in epithelial envelopment. *J. Cell. Biol.* 130: 79-91.

DURBEEJ M, FECKER L, HJALT T, ZHANG HY, SALMIVIRTA K, KLEIN G, TIMPL R, SOROKIN L, EBENDAL T, EKBLOM P and EKBLOM M (1996): Expression of laminin $\alpha 1$, $\alpha 5$ and $\beta 2$ chains during embryogenesis of the kidney and vasculature. *Matrix Biol.* 15: 397-413.

DURBEEJ M, JUNG D, HJALT T, CAMPBELL KP and EKBLOM P (1997): Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev. Biol.* 181: 156-167.

DURBEEJ M, HENRY MD and CAMPBELL KP (1998a): Dystroglycan in development and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 594-601.

DURBEEJ M, HENRY MD, FERLETTA M, CAMPBELL KP and EKBLOM P (1998b): Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 449-457.

EHRIG K, LEIVO I, ARGRAVES WS, RUOSHLATI W and ENGVALL E (1990):

Merosin, a specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 3264-3268.

ENGVAL E (1993): Laminin variants: why, where and when? Kidney Int. 43: 2-6.

ENGVAL E and WEWER UM (1996): Domains of laminin. J. Cell. Biochem. 61: 493-501.

ENGVAL E, EARWICKER D, HAAPARANTA T, RUOSLAHTI E and SANES JR

(1990): Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. Cell Regul. 1: 731-740

ERVASTI JM and CAMPBELL KP (1993): A role for dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. J. Cell. Biol. 122: 809-823.

ERVASTI JM, OHLENDIECK K, KAHL SD, GAVER MG and CAMPBELL KP

(1990): Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. Nature (Lond.) 345: 315-319.

FRIEDRICHS K, RUIZ P, FRANKE F, GILLE I, TERPE HJ and IMHOF BA (1995):

High expression level of $\alpha 6$ integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. Cancer Res. 55: 901-906.

GARBETT EA, REED MW, STEPHENSON TJ and BROWN NJ (2000): Proteolysis

in human breast cancer. Mol. Pathol. 53: 99-106.

GEE SH, MONTANARO F, LINDENBAUM MH and CARBONETTO S (1994):

Dystroglycan- α , a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. Cell 77: 675-686.

GIANNELLI G, FALK-MARZILLIER J, SCHIRALDI O, STETLER-STEVENSON W

and QUARANTANA V (1997): Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin 5. Science 277: 225-228.

GLANTZ SA (1997): Wie man Häufigkeiten und Anteile analysiert. In: Glantz SA

(Hrsg. d. engl. Ausgabe), Heinecke A und Köpcke W (Hrsg. d. dt. Ausgabe): Biostatistik – Ein Fach für die Praxis, Mc-Graw-Hill International, Maidenhead, Berkshire, UK, S. 132-137.

GLEIBER WE and SCHIFFMANN E (1984): Identification of a chemoattractant for

fibroblasts produced by human breast carcinoma cell lines. Cancer Res. 44: 3398-3402.

GORCZYCA W, HOLM R and NESLAND JM (1993): Laminin production and fibronectin immunoreactivity in breast carcinomas. *Anticanc. Res.* 13: 851-858.

GOECKI DC, DERRY JMJ and BARNARD EA (1994): Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse. *Hum. Mol. Gen.* 3: 1589-1597.

GOULD VE, JAO W and BATTIFORA H (1980): Ultrastructural analysis in the differential diagnosis of breast tumors – The significance of myoepithelial cells, basal lamina, intracytoplasmic lumina and secretory granules. *Path. Res. Pract.* 167: 43-70.

GUELSTEIN VI, TCHYPYSHEVA TA, ERMILOVA VD and LJUBIMOV AV (1993): Myoepithelial and basement membrane antigens in benign and malignant human breast tumors. *Int. J. Canc.* 53 : 269-277.

HAO J, YANG Y, MC DANIEL KM, DALKIN BL, CRESS AE and NAGLE RB (1996): Differential expression of laminin 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) by human malignant and normal prostate. *Am. J. Pathol.* 149: 1341-1349.

HART IR and SAINI A (1992): Biology of tumour metastasis. *Lancet* 339: 1453-1457.

HASEGAWA T, HIROSE T, KUDO E, ABE JI and HIZAWA K (1990): Cytoskeletal characteristics of myofibroblasts in benign and reactive fibroblastic lesions. *Virch. Arch.* 416: 375-382.

HENRY MD and CAMPBELL KP (1996): Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 625-631.

HENRY MD and CAMPBELL KP (1998): A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95: 859-870.

HENRY MD, COHEN MB and CAMPBELL KP (2001): Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer. *Hum. Pathol.* 32: 791-795.

HEMLER M (1999): Dystroglycan versatility. *Cell* 97: 543-546.

HEWITT RE, POWE DG, MORRELL K, BAILEY E, LEACH IH, ELLIS IO and TURNER DR (1997): Laminin and collagen IV subunit distribution in normal and neoplastic tissue of colorectum and breast. *Brit. J. Cancer* 75: 221-229.

HOCH W (1999): Formation of the neuromuscular junction - Agrin and its unusual receptors. *Eur. J. Biochem.* 265: 1-10.

HUTTER H, VOGEL BE, PLENEFISCH JD, NORRIS CR, PROENCA RB, SPIETH J, GUO C, MASTWAL S, ZHU X, SCHEED J, and HEDGECOCK EM (2000): Conservation and novelty in evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* 287: 989-994.

HYNES RO (1996): Targeted mutations in cell adhesion genes: What have we learned from them? *Dev. Biol.* 180: 402-412.

IBRAGHIMOV-BRESKROVNAYA O, ERVASTI JM, LEVEILLE CJ, SLAUGHTER CA, SERNETT SW and CAMPBELL KP (1992): Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature (Lond.)* 355: 696-702.

IBRAGHIMOV-BRESKROVNAYA O, MILATOVICH A, OZCELIK T, YANG B, KOEPNICK K, FRANCKE U and CAMPBELL KP (1993): Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Gen.* 2: 1651-1657.

IIVAINEN A, SAINIO K, SARIOLA H and TRYGGVASON K (1995): Primary structure and expression of a novel human laminin alpha 4 chain. *FEBS Lett.* 365: 183-188.

IOZZO RV (1998): Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 609-652.

JUNG D, YANG B, MEYER J, CHAMBERLAIN JS and CAMPBELL KP (1995): Identification and characterization of the dystrophin anchoring site of β -dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 270: 27305-27310.

KACHINSKY AM, FROEHNER SC and MILGRAM SL (1999): APDZ-containing scaffold related to the dystrophin complex at the basolateral membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 145: 391-402.

KOCH M, OLSON PF, ALBUS A, JIN W, HUNTER DD, BRUNKEN WJ, BURGESSON RE and CHAMPLIAUD MF (1999): Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J. Cell. Biol.* 145: 605-618.

KOSMEHL H, BERND A and KATENKAMP D (1996): Molecular variants of fibronectin and laminin: Structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch.* 429: 311-322 .

KOSTROMINOVA T and TANZER M (1995): Temporal and spatial appearance of alpha-dystroglycan in differentiated mouse myoblasts in culture. *J. Cell. Biochem.* 58: 527-534.

LANDGRAF JB, BAUKNECHT KJ und HÄRING R: Ausbreitung und Grading von Tumoren In: R.Häring und H.Zilch (Hrsg.): *Lehrbuch der Chirurgie*, W. de Gruyter Verlag, Berlin und Gosslar (1997), S. 226-229.

LIM LE and CAMPBELL KP (1998): The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 11: 443-452.

LIN JJ, LIN JL and DAVIS-NANTHAKUMAR EJ (1988) : Monoclonal antibodies against caldesmon, a calcium/calmodulin- and actin binding protein of smooth muscle and nonmuscle cells. *Hybridoma.* 7: 273-288.

LIPPONEN P, JI H, AALTOMAA S and SYRJÄNEN K (1994): Tumour vascularity and basement membrane structure in breast cancer as related to tumour histology and prognosis, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120: 645-50.

LIOTTA LA, RAO CN, BARSKY SH and BRYANT G (1984): The laminin receptor and basement dissolution: role in tumor metastasis. *Ciba Found. Symp.* 108: 146-162.

LOSASSO C, DI TOMMASO F, SGAMBATO A, ARDITO R, CITTADINI A, GIARDINA B, PETRUCCI TC and BRANCACCIO A (2000): Anomalous dystroglycan in carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* 484: 194-198.

LOWENSTEIN EJ, DALY RJ and BATZER AG (1992): The SH2 and SH3 domain containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signalling. *Cell* 70: 431-442.

MARTIN D, ZUSMAN S, LI X, WILLIAMS EL, KHARE N, DA ROCHA S, CHIQUET-EHRISMANN R and BAUMGARTNER S (1999): Wing blister, a new drosophila laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J. Cell. Biol.* 145: 191-201.

MATSUMURA K, YAMADA H, SHIMIZU T and CAMPBELL KP (1993): Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett.* 334: 281-285.

MATSUMURA K, YAMADA H, SAITO F, SUNADA Y and SHIMIZU T (1997): The role of dystroglycan, a novel receptor of laminin and agrin, in cell differentiation *Histol. Histopathol.* 12: 195-203.

MINER JH, LEWIS RM, and SANES JR (1995): Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J. Biol. Chem.* 270: 28523-28526.

MONTANARO F, GEE SH, JACOBSON C, LINDENBAUM MH, FROEHNER SC and CARBONETTO S (1998): Laminin and α -dystroglycan mediate acetylcholin receptor aggregation via a Mu-SK-independent pathway. *J. Neurosci.* 18: 1250-1260.

MUSCHLER J, LEVY D, BOUDREAU R, HENRY M, CAMPBELL K and BISSELL ML (2002): A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res.* 62 (23): 7102-7109.

ONO Y, NAKANISHI Y and INO Y (1999) : Clinicopathologic significance of laminin-5 (γ 2 chain) in squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 85: 2315-2321.

RAATS CJI, van den BORN J, BAKKER MAH, OPPERS-WALGREEN B, PISA BJM, DIJKMAN HBPM, ASSMANN KJM and BERDEN JHM (2000): Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am. J. Pathol.* 156: 1749-1765.

RAMBUKKANA A, YAMADA H, ZANAZZI G, MATHUS T, SALZER JL, YURCHENCO PD, CAMPBELL KP and FISCHETTI VA (1998): Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 282: 2076-2079.

RAYMOND WA and LEONG ASY (1991): Assessment of invasion in breast lesions using antibodies to basement membrane components and myoepithelial cells. *Pathol.* 23: 291-297.

RICHARDS AJ, AI IMARA L, CARTER NP, LLOYD JC, LEVERSHA MA and POPE FM (1994): Localization of the gene (LAMA4) to chromosome 6q21 and isolation of a partial cDNA encoding a variant laminin A chain. *Genomics* 22: 237-239.

ROHRBACH R: Basalmembranläsionen, In Riede UN und Schäfer HE (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Thieme, Stuttgart (1995), S. 58-60.

RONNOV-JESSEN L, VAN DEURS B, CELIS JE and PETERSEN OW (1990): Smooth muscle differentiation in cultured human breast gland stromal cells. *Lab. Invest.* 63: 532-543.

SATO H, TAKINO T, OKADA Y, CAO J, SHINAGAWA A, YAMOTO E and SEIKI M (1994): *Nature (Lond.)* 370: 61-65.

SCHMITT-GRÄFF A, KRÜGER S, BOCHARD F, GABBIANI G and DENK H (1991): Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am. J. Pathol.* 138: 1233-1242.

SCHOFIELD JN, GORECKI DC, BLAKE DJ, DAVIES K and EDWARDS YH (1995): Dystroglycan mRNA expression during normal and mdx mouse embryogenesis: a comparison with utrophin and apodystrophins. *Dev. Dyn.* 204: 178-185.

SCHULER F and SOROKIN LM (1995): Expression of laminin isoforms in mouse myogenic cells in vitro and in vivo. *J. Cell. Sci.* 108: 3795-3805.

SECHLER JL, CORBETT SA, WENK MB and SCHARZBAUER JE (1998): Modulation of cell - extracellular matrix interactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 857: 143-154.

SEWRY CA, PHILPOT J, SOROKIN LM, WILSON LA, NAOM I, GOODWIN F, D'ALESSANDRO M, DUBOWITZ V and MUNTONI F (1996): Diagnosis of merosin (laminin 2) deficient congenital muscular dystrophy by skin biopsy. *Lancet* 347: 582-584.

SGAMBATO A, MIGALDI M, MONTANARI M, CAMERININ A, BRANCACCIO A, ROSSI G, CANGIANO R, LOSASSO C, CAPELLI G, TRENTINI GP and CITTADINI A (2003): Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. *Am. J. Pathol.* 162(3): 849-860.

SILVERSTEIN MJ, POLLER DN and BARTH A (1996): Intraductal breast carcinoma: experiences from the Breast Center in Van Nuys, California. *Cancer Res.* 140: 139-153.

SINN HP, KELLERHOFF NM, KELLERHOFF R, BASTERT G und OTTO HF (1997): Subtypisierung und Prognoseabschätzung beim invasiv lobulären Mammakarzinom. *Pathologie* 18: 37-44.

SKALLI O, ROPRAZ P, TRZECIAK A, BENZONANA G, GILLESSEN D and GABBIANI G (1986): A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. *J. Cell Biol.* 103: 2787-2796.

SKALLI O, PELTE MF, PECLET MC, GABBIANI G, GUGLIOTTA P and BUSSOLATI G (1989a): Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 315-321.

SKALLI O, SCHÜRCH W, SEEMAYER T, LAGACE R, MONTANDON D and PITTED B (1989b): Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogenous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab. Invest.* 60: 275-285.

SMALHEISER NR and KIM E (1995): Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties. *J. Biol. Chem.* 270: 15425-15433.

SMALHEISER NR and SCHWARTZ NB (1987): Cranin, a laminin binding protein of cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 6457-6461.

STRASSBURGER S, BERNDT A, HYCKEL P, KATENKAMP D and Kosmehl H (1998): Differential expression of laminin chains in the human major salivary gland. *Histochem. J.* 30: 81-88.

STREULI CH, SCHMIDHAUSER C, BAILEY N, YURCHENCO P, SKUBITZ AP, ROSKELLEY C and BISELL MJ (1995): Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J. Cell. Biol.* 129: 591-603.

SUGIYAMA J, BOWEN D and HALL Z (1994): Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron* 13: 103-115.

TER LAAK HJ, LEYTE QH, GABREELS FJM, KUPPEN H, RENIER WO and SENGERS RCA (1997): Laminin-alpha(2) (merosin), beta-dystroglycan, alpha-sarcoglycan (adhalin), and dystrophin expression in congenital muscular dystrophies: An immunohistochemical study. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 100: 5-10.

TIAN M, JACOBSON C, GEE SH, CAMPBELL KP, CARBONETTO S and JUCKER M (1996): Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2739-2747.

TIMPL R and BROWN JC (1996): Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* 18: 123-132.

TINSLEY JM, BLAKE DJ, ROCHE A, FAIRBROTHER U, RISS I, BYTH BC, KNIGHT AE, KENDRICK-JONES I, SUTHERS GK and LOVE DR (1992): Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature (Lond.)* 360: 591-593.

TINSLEY JM, BLAKE DJ, ZUELLIGG RA and DAVIES KE (1994): Increasing complexity of the dystrophin-associated complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8307-8313.

- TINSLEY JM, POTTER AC, PHELPS SR, FISHER R, TRICKET JI and DAVIES KE (1996)** : Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature (Lond.)* 384: 349-353.
- TOME FM, MATSUMURA K, CHEVALLAY M, CAMPBELL KP and FARDEAU M (1994)**: Expression of dystrophin-associated glycoproteins during human fetal muscle development: a preliminary immunocytochemical study. *Neuromusc. Disord.* 4: 343-348.
- VASSALLI ID and PEPPER MS (1994)**: Tumour biology. Membrane proteases in focus. *Nature (Lond.)* 370, 14-15.
- VIRTANEN I, LAITINEN L and KORHONEN M (1995)**: Differential expression of laminin polypeptides in developing and adult human kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 621-628.
- WANG NP, WAN BC, SKELLY M, FRID MG, GLUKHOVA MA, KOTELIANSKY VE and GOWN AM (1997)**: Antibodies to novel myoepithelium-associated proteins distinguish benign lesions and carcinoma in situ from invasive carcinoma of the breast. *App. Immun. Histochem.* 5(3): 141-151.
- WEWER UM and ENGVALL E (1996)**: Merosin/laminin 2 and muscular dystrophy. *Neuromuscular. Disord.* 6: 409- 418.
- WILLIAMSON RA, HENRY MD, DANIELS KJ, HRSTKA RF, LEE JC, SUNADA Y, IBRAGHIMOV-BRESKROVNAYA O and CAMPBELL KP (1997)**: Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum. Mol. Genet.* 6: 831-841.
- WINDER SJ (1997)**: The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18: 617-629.
- WINDER SJ (2001)**: The complexities of dystroglycan. *Trends in Biochem. Sciences* 26 (2): 118-124.
- WITTEKIND C und RIEDE UN**: Brustdrüse. In: Riede UN und Schäfer HE (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Thieme, Stuttgart (1995), S. 955-961.
- WITTEKIND C und WAGNER G**: Brustdrüse. In: Wittekind C und Wagner G (Hrsg.): *TNM Klassifikation maligner Tumoren*, Springer, Berlin und Heidelberg (1997), S.119-126.
- WOODHOUSE EC, CHUAQUI RF and LIOTTA LA (1997)**: General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80: 1529-1537.

YANG B, JUNG D, MOTTO D, MEYER J, KORETZKY G and CAMPBELL KP (1995) : SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. J. Biol. Chem. 270: 11711-11714.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist. Ich habe die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts haben mich folgende Personen unterstützt:

Herr Prof. Dr. med. Hartwig Kosmehl,
Frau Barbara Berghoff (MTA) und
Frau Christiane Geier (MTA)

Ich versichere, dass die Hilfe eines Promotionsberaters von mir nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde von mir noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Eine gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung habe ich nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 10.06.2003

Constanze Stockmann-Fleck

10. Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung während der Anfertigung der Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. H. Kosmehl. Seine Hinweise und Ratschläge waren stets wertvoll und mir zu jeder Zeit eine große Hilfe.

Mein Dank gilt auch Frau Barbara Berghoff und Frau Christiane Geier, die mir bei der Anfertigung der histologischen Präparate stets behilflich waren.

Ich bedanke mich auch bei meinem Ehemann und meiner Familie, die mich jederzeit unterstützten und mir dadurch die Anfertigung der Arbeit wesentlich erleichterten.

11. Lebenslauf

Name: Constanze Christiane **Stockmann-Fleck**, geb. Fleck
Geburtsdatum: 14.04.1977
Geburtsort: Gera
Wohnort: Erfurter Str. 60, 07743 Jena
Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Ausbildung:

Sept. 1983 - Aug. 1991	Polytechnische Oberschule „Arthur Becker“, Jena
Sept. 1991 - Aug. 1995	Staatliches Gymnasium „Albert Schweitzer“, Jena
Okt. 1995 - Okt. 2001	Studium der Humanmedizin FSU Jena
Okt. 2001	Zulassung als Ärztin im Praktikum
Okt. 2001 – Aug. 2002	Mutterschaftsurlaub
Seit Sept. 2002	ÄiP, Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie der FSU Jena

Jena, den 10.06.2003

Constanze Stockmann-Fleck